

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
ISABELLE ST-LOUIS**

**RÉGULATION ET RÔLE DES PROSTAGLANDINES AU NIVEAU DES
CELLULES ENDOMÉTRIALES CHEZ LA RATE PENDANT LE CYCLE
OESTRAL, LA GESTATION ET LA PSEUDOGESTATION**

DÉCEMBRE 2008

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les étudiants du laboratoire, Steve Turner, Marie-Claude Dery, Lyne Lafontaine, et Céline Van Themsche, pour leur aide et leurs conseils qui m'ont aidé à progresser dans mes recherches.

Je tiens également à remercier les professionnels de recherche, Valérie Leblanc et Sophie Parent, ainsi que les techniciennes à l'animalerie, Rollande Caron et Nadia Deschênes, pour le support qu'elles m'ont offertes tout au long de la réalisation de ma maîtrise.

D'autre part, je tiens à exprimer ma reconnaissance envers mon directeur de recherche, Éric Asselin, qui m'a fait confiance et m'a permis de mener à terme mon projet de recherche au cours de ces années.

Finalement, je n'aurais pas pu réaliser ce projet de maîtrise sans l'appui de ma famille et plus particulièrement mon mari. À tous, je tiens à leur offrir mes sincères remerciements.

RÉSUMÉ

Les prostaglandines (PGs) sont des médiateurs lipidiques et sont impliquées dans plusieurs fonctions reproductrices chez la femme incluant l'ovulation, l'implantation, la décidualisation et la parturition. Les prostaglandines dérivent de la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine endoperoxyde par deux enzymes clés : les cyclooxygénases 1 et 2 (COX-1 et COX-2). Les principaux objectifs de ce projet de recherche étaient d'étudier l'expression et la régulation de COX-1 et COX-2 durant la gestation, la pseudogestation et le cycle oestral chez la rate afin de déterminer leurs rôles respectifs. De plus, un des buts de cette étude était de caractériser l'expression des prostaglandines (PGE₂, PGF₂ α , PGD₂ et PGI₂) et par le fait même, déterminer si l'augmentation de l'expression de certaines prostaglandines à des étapes précises de la gestation, de la pseudogestation et du cycle oestral correspond à l'expression de l'une ou des deux cyclooxygénases.

Les hypothèses émises dans le cadre de cette étude sont que COX-2 joue un rôle clé dans l'implantation et la régression déciduale durant la gestation chez la rate et que COX-2 est aussi régulé par les hormones stéroïdiennes tout comme COX-1. De façon générale, l'hypothèse était les cyclooxygénases et les prostaglandines produites au cours de la gestation sont des régulateurs importants dans l'implantation, la décidualisation, la régression déciduale et la parturition.

Afin de réaliser cette étude, des utérus de rates ont été prélevés durant le cycle oestral, la gestation et la pseudogestation. Les protéines et l'ARN de l'endomètre ont été extraits et ensuite utilisés respectivement pour des analyses de type Western Blot ainsi que des analyses RT-PCR en temps réel. Des coupes de tissus utérins ont également été préparées afin de localiser les protéines par immunohistochimie. Quant à la quantification des métabolites de PGF₂ α et PGE₂ dans le sérum des rates, elle a été réalisée par ELISA.

Suite à ces analyses, COX-1 et COX-2 ont été détectés dans le tissu utérin de la rate durant le cycle oestral, la gestation et aussi durant la pseudogestation. Les résultats

obtenus démontrent que l'expression de la protéine COX-2 est modulée durant le cycle oestral. Quant à COX-1, son expression était élevée durant l'implantation, la décidualisation et la parturition. La protéine COX-2 a été détectée en début de gestation (jours 2 à 5) et une augmentation de son expression a été détectée durant la régression déciduale. COX-2 était également induite lors de la parturition. L'expression des deux protéines était modulée durant la pseudogestation, ce qui indique que ces enzymes seraient régulées entre autres par l'estrogène et la progestérone.

PGIS et PGDS, qui sont les enzymes permettant la synthèse respective de PGI₂ et PGD₂, ont été détectées dans l'endomètre de la rate durant la gestation, la pseudogestation et aussi durant le cycle oestral. PGIS était fortement présente en début de gestation, plus particulièrement au jour 5, et diminuait graduellement du jour 5,5 à 6,5. Le niveau de PGIS était maximal au jour 12 et diminuait jusqu'à la fin de la gestation. Quant à PGDS, son expression était élevée en début de gestation et maximal lors de la parturition. Durant la pseudogestation, le niveau de PGDS et de PGIS était maximal au jour 5.

En ce qui a trait aux métabolites, une augmentation du métabolite de PGF₂α a été détectée durant le proestrus ainsi que le métrustrus et le métabolite de PGE₂, durant le proestrus. Durant la gestation, une hausse du métabolite de PGE₂ a été décelée aux jours 10, 12 ainsi que 14 et au jour 14 pour le métabolite de PGF₂α, ce qui correspond à la régression déciduale. Finalement, les résultats de cette étude ont démontré que la concentration des métabolites variait durant la pseudogestation et que les métabolites de PGI₂, PGE₂ ainsi que PGF₂α augmentaient au jour 7. Quant au métabolite de PGD₂, une hausse significative a été détectée dans le sérum des rates aux jours 21 et 22 de gestation.

Ces résultats démontrent que COX-1 et COX-2 sont régulés différemment par les hormones stéroïdiennes et seraient impliqués, de même que les prostaglandines PGD₂, PGI₂, PGE₂ ainsi que PGF₂α, aux étapes clés de la gestation, c'est-à-dire l'implantation, la décidualisation, la régression déciduale ainsi que la parturition. De plus, COX-2 serait impliqué dans le contrôle de la mort cellulaire durant l'implantation et la régression déciduale, mais aussi au cours du cycle oestral chez la rate.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ.....	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	X
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Problématique.....	1
1.2 Le système reproducteur de la rate	2
1.3 Le cycle oestral, la gestation et la pseudogestation.....	3
1.4 Les hormones stéroïdiennes.....	18
1.5 Les prostaglandines	20
1.6 L'apoptose	29
1.7 Hypothèses	31
1.8 Objectifs spécifiques.....	32
CHAPITRE 2 ARTICLE 1	33
2.1 Préface	33
2.2 Résumé de l'Article	33
2.3 Article	36
CHAPITRE 3 ARTICLE 2	73
3.1 Préface	73
3.2 Résumé de l'Article	73
3.3 Article	75
CHAPITRE 4 DISCUSSION ET CONCLUSION.....	106
4.1 Discussion	106
4.2 Conclusion	114

4.3 Perspectives de recherche	116
BIBLIOGRAPHIE.....	117

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1 : La transduction des signaux par les récepteurs des prostaglandines (Narumiya et al 1999)	28
---	----

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1: A) Système reproducteur de la rate (Rugh 1994); B) Distribution des blastocystes au jour 5 de la gestation chez la rate; C) Distribution des blastocystes au jour 8 de la gestation chez la rate.	3
FIGURE 1.2 : Représentation des différentes phases du cycle menstruel chez la femme où A représente la période des menstruations; B, la phase proliférative; C, la phase sécrétoire et D, la fenêtre d'implantation	5
FIGURE 1.3 : Profils hormonaux chez la rate au cours du cycle oestral.....	6
FIGURE 1.4 : Frottis vaginaux de la rate aux différents stades du cycle oestral (diestrus, proestrus, oestrus et métrus).	7
FIGURE 1.5 : Schématisation de la gestation chez la rate et de ses principales étapes.....	8
FIGURE 1.6 : Schéma démontrant la position du blastocyste dans la cavité utérine.	11
FIGURE 1.7 : Schéma des différentes phases de l'implantation.....	12
FIGURE 1.8 : A) Stroma d'un endomètre humain en phase proliférative; B) Stroma lors de la décidualisation en début de gestation	15
FIGURE 1.9 : Biosynthèse des prostaglandines	23
FIGURE 2.1 COX-1 mRNA and protein abundance in female rat endometrium during estrous cycle.	63
FIGURE 2.2 COX-1 mRNA and protein abundance in female rat endometrium during pregnancy at different days.	64
FIGURE 2.3 COX-1 mRNA and protein expression in female rat endometrium during pseudopregnancy.....	65
FIGURE 2.4 COX-2 protein abundance in female rat endometrium during estrous cycle	66
FIGURE 2.5 COX-2 expression in female rat endometrium during A) early and B) late pregnancy	67
FIGURE 2.6 COX-2 protein expression in female rat endometrium during pseudopregnancy.....	68
FIGURE 2.7 Immunoreactivity of COX-1 in rat endometrium during pregnancy and estrous cycle.....	69

FIGURE 2.8 Immunoreactivity of COX-2 in rat endometrium during pregnancy and estrous cycle	70
FIGURE 2.9 PGE ₂ metabolites concentrations in serum from A) pregnant rats B) pseudopregnant rats and C) from polyoestrus cycling rats at each stage of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus)	71
FIGURE 2.10 PGF ₂ α metabolites concentrations in serum from A) pregnant rats B) pseudopregnant rats and C) from polyoestrus cycling rats at each stage of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus)	72
FIGURE 3.1 PGDS and PGIS expression in the female rat endometrium during estrous cycle	99
FIGURE 3.2 PGIS expression in the female rat endometrium during pregnancy	100
FIGURE 3.3 PGDS expression in the female rat endometrium during pregnancy	101
FIGURE 3.4 PGDS and PGIS expression in the female rat endometrium during the pseudopregnancy.....	102
FIGURE 3.5 Immunohistochemical staining was performed to localize PGDS and PGIS proteins in the rat endometrium	103
FIGURE 3.6 PGD ₂ and PGI ₂ metabolites metabolites concentrations in serum were determined during the estrous cycle (A and B) and pregnancy (C and D) by enzyme immunoassay (EIA)	104
FIGURE 3.7 A) PGD ₂ and B) PGI ₂ metabolites metabolites concentrations in serum were determined during pseudopregnancy by enzyme immunoassay (EIA).....	105

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

ATP	Adénosine triphosphate
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
GTP	Guanosine triphosphate
GMP	Guanosine monophosphate
ARN	Acides ribonucléiques
ARNm	ARN messenger
ADN	Acides désoxyribonucléiques
COX	Cyclooxygénase
COX-1	Cyclooxygénase de type 1
COX-2	Cyclooxygénase de type 2
PLA2	Phospholipase A2
PGs	Prostaglandines
PGE2	Prostaglandine E2
PGI2	Prostaglandine I2
PGF ₂	Prostaglandine F2 alpha
PGD2	Prostaglandine D2
PGH2	Prostaglandine endoperoxyde H2
PGG2	Prostaglandine G2
PGDS	Prostaglandin D synthétase
PGIS	Prostacycline synthétase
H-PGD2	Prostaglandine de type hématopoïétique
L-PGD2	Prostaglandine de type lipocalin
EP	Récepteurs des prostaglandines E
DP1	Récepteur de la prostaglandine D de type 1
DP2	Récepteur de la prostaglandine D de type 2
IP	Récepteurs des prostaglandines I
LH	Hormone lutéinisante

FSH	Hormone Folliculo-stimulante
DHEA	Déhydroépiandrostérone
E ₁	Oestrone
E ₂	17β-estradiol
E ₃	Oestriol
ER	Récepteurs des œstrogènes
ERα	Récepteurs à l'œstrogène alpha
ERβ	Récepteurs à l'œstrogène bêta
P4	Progestérone
PR	Récepteurs de la progestérone
PR-A	Récepteurs à la progestérone de type A
PR-B	Récepteurs à la progestérone de type B
IAPs	Inhibitor of apoptosis proteins
Ca ²⁺	Calcium
kDa	Kilodalton
ATP	Adénosine triphosphate
ADP	Adénosine diphosphate
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BAD	BCL2-antagonist of cell death
BAX	BCL2-associated X protein
Caspases	Cysteine aspartic acid-specific proteases
IHC	Immunohistochimie
Vol.	Volume
p.	Page
Et al.	Plus d'un auteur
Min	Minute
fig.	Figure
°C	Degré celsius
g	gramme
μg	microgramme
ng	nanogramme

kg	kilogramme
µm	micromètre
mM	milli molaire
ml	millilitre
PBS	Phosphate buffer salt
BSA	Bovine serum albumine
SDS	Sodium dodecyl sulfate
GH	Growth hormone
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 PROBLÉMATIQUE

L'infertilité féminine est un problème qui peut être relié à une mauvaise communication entre l'embryon et le tissu utérin ce qui se résulte par un échec de l'implantation embryonnaire. La réussite de l'implantation embryonnaire dépend de la synchronisation entre le développement de l'embryon et la période de réceptivité de l'utérus. Pendant l'implantation, plusieurs interactions se produisent entre l'embryon et le tissu utérin de la mère, lesquelles sont médiées par différentes signalisations cellulaires. Ces échanges seraient entre autres médiés par des facteurs de croissance, des hormones, des molécules d'adhésion, la matrice extracellulaire et les prostaglandines. Dans le but de corriger un jour l'infertilité féminine et les différents problèmes qui peuvent survenir durant la gestation telles les naissances prématurées, il faut tout d'abord connaître les différents mécanismes ainsi que les diverses voies de signalisation impliqués aux étapes clés de la gestation comme l'implantation de l'embryon. Encore de nos jours, une naissance prématurée survient dans 5 à 10% des grossesses et sur ces naissances, 50% d'entre elles sont de nature idiopathique (de cause inconnue) (Challis et al. 2002).

Les prostaglandines, qui sont des médiateurs de nature lipidique, ont fait l'objet de recherches depuis plusieurs années. Ces dernières tendent à démontrer un rôle important de certaines prostaglandines à des stades critiques de la gestation (Challis et al. 2002; Kennedy 1980; Reese et al. 2000; Neil 1994). Les cyclooxygénases sont des enzymes essentielles et limitantes pour la synthèse des prostaglandines. C'est pourquoi l'étude de leur régulation et la détermination de leur rôle respectif lors de la gestation et aussi durant le cycle oestral sont importantes.

Puisque l'étude de ces protéines est difficile à réaliser durant la gestation chez la femme, les chercheurs ont recours à des modèles animaux tels les souris, les rats, les

ruminants, etc. Dans ce cas présent, c'est le rat qui a été utilisé afin de réaliser ce projet de recherche.

1.2 LE SYSTÈME REPRODUCTEUR DE LA RATE

1.2.1 Anatomie du système reproducteur (composantes)

Le système reproducteur de la rate est composé de deux ovaires, deux cornes utérines, de l'utérus, d'un vagin ainsi que d'un clitoris et d'une paire de glandes clitoridiennes (Rugh 1994) tel que représenté à la figure 1.1. Les ovaires, qui sont reliés aux cornes utérines, assurent plusieurs fonctions tout comme chez l'humain. L'ovaire est le lieu de maturation folliculaire qui mène à la production d'ovules et est un lieu de synthèse d'hormones telles l'œstrogène et la progestérone.

Contrairement à la femme, l'utérus de la rate est en forme d'Y, tout comme chez la souris, en raison des deux longues cornes utérines tel que représenté dans la figure 1.1 de ce présent document. De l'extérieur vers l'intérieur de l'utérus, on retrouve une couche de cellules musculaires (myomètre), des cellules stromales et puis l'épithélium (endomètre).

1.2.2 Le système reproducteur chez le rongeur

Le rat est un animal qui a une reproduction rapide. Il atteint sa maturité sexuelle dès l'âge de 6 semaines et peut avoir jusqu'à 5 portées par année, car la gestation est relativement courte. En effet, la gestation dure de 21 à 23 jours et la femelle a en moyenne 10 ratons par portée. Les sites d'implantation sont situés au niveau des cornes utérines tel que représenté dans la figure 1.1 ci-dessous. Au cours de cette étude, la rate a été utilisée comme modèle animal pour plusieurs raisons. Tout d'abord, c'est un petit animal, ce qui facilite les manipulations, la durée de gestation est courte et aussi, son implantation est de type hémochoriale tout comme l'humain, c'est-à-dire, qu'il y a un contact direct entre le sang maternel et l'embryon.

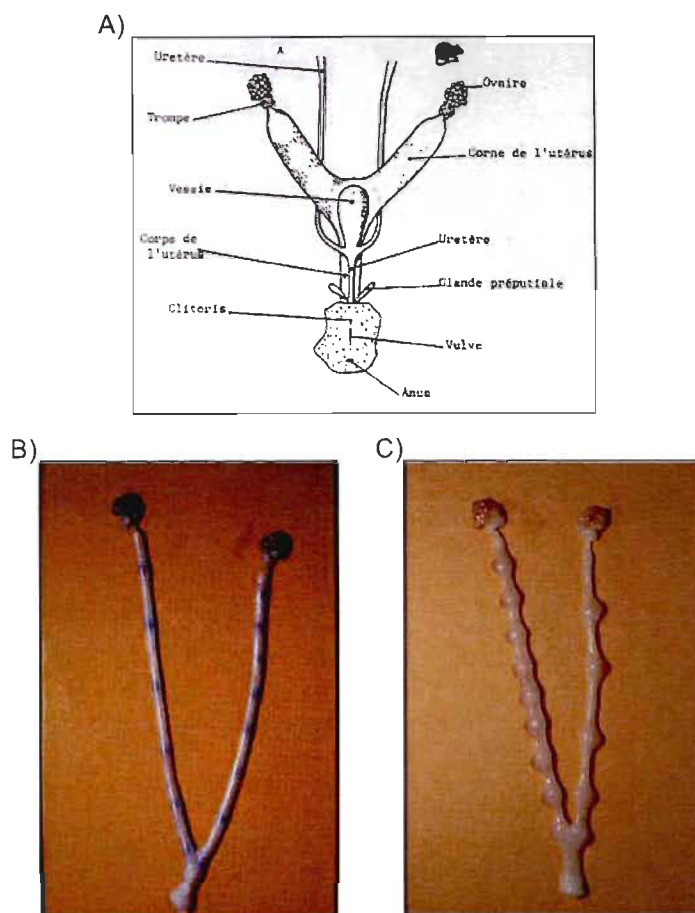


FIGURE 1.1: A) Système reproducteur de la rate (Rugh 1994); B) Distribution des blastocystes au jour 5 de la gestation chez la rate; C) Distribution des blastocystes au jour 8 de la gestation chez la rate.

1.3 LE CYCLE OESTRAL, LA GESTATION ET LA PSEUDOGESTATION

1.3.1 Le cycle oestral

L'activité des ovaires est cyclique et entraîne des changements particuliers dans l'utérus, lesquels varient selon les différentes espèces. C'est ce que l'on nomme le cycle oestral. Ce dernier est divisé en quatre parties : le diestrus (phase lutéale), le proestrus (phase folliculaire), l'oestrus (ovulation) et le métrus. Selon les espèces, la durée du cycle varie et l'ovulation peut être soit spontanée, comme chez le rat, soit provoquée

suite à un accouplement, comme chez le lapin (Levasseur et al. 2001). Chez l'humain, on parle de cycle menstruel et chez le rat, de cycle oestral.

1.3.1.1 Le cycle menstruel chez l'humain

À partir de la puberté et ce jusqu'à la ménopause chez la femme, l'endomètre utérin est soumis à des variations hormonales cycliques. Chez l'humain, ce sont les menstruations qui débutent ce cycle lorsqu'il n'y a pas eu fécondation. Cette étape est caractérisée par la régression du corps jaune, une diminution des hormones ovariennes et l'élimination de la partie fonctionnelle de l'endomètre.

La phase qui suit les menstruations est la phase folliculaire ou proliférative. Les hormones jouent un rôle important lors du cycle oestral, car elles permettent d'assurer une synchronisation entre la croissance folliculaire, l'ovulation ainsi que la préparation de l'endomètre pour l'implantation de l'embryon. Pendant la phase folliculaire, l'adénohypophyse sécrète en petite quantité les hormones FSH (hormone folliculo-stimulante) et LH (hormone lutéinisante). La FSH stimule la croissance des follicules ovariens et ces derniers sécrètent de l'œstrogène, ce qui permet la prolifération des cellules de l'endomètre (Campbell 1995). Lorsque la sécrétion d'œstrogène est maximale, il y a déclenchement de l'ovulation (Levasseur et al. 2001).

Après l'ovulation débute la phase lutéale ou sécrétoire qui est caractérisée par la maturation de l'endomètre et la sécrétion de progestérone. C'est au cours de cette phase que l'endomètre devient réceptif et favorable à l'implantation embryonnaire (Humphrey 1969). C'est que l'on appelle la fenêtre d'implantation. Le corps jaune est formé à partir du tissu folliculaire qui est resté dans l'ovaire et sécrète de l'estrogène et de la progestérone. Plus précisément, la constitution du corps jaune se fait par la transformation morphologique et fonctionnelle (nommée lutéinisation) des cellules de la thèque interne et de la *granulosa* du follicule ovulant (Levasseur et al. 2001). Lors de la lutéinisation, il y a une forte sécrétion de progestérone.

L'œstrogène et la progestérone permettent le maintien et le développement de l'endomètre. À ce stade, l'endomètre est très irrigué, principalement en raison du grossissement des artères. La vascularisation de l'endomètre joue un rôle important lors de l'implantation du blastocyste et les changements vasculaires contribueraient à la réceptivité utérine (Roger 1996). Lors de la progression de la phase lutéale, la quantité d'œstrogène et de progestérone amène une diminution de LH et FSH (par rétro inhibition sur l'hypothalamus). En absence de fécondation, le corps jaune régresse et la diminution des hormones entraîne la dégénérescence de l'endomètre utérin.

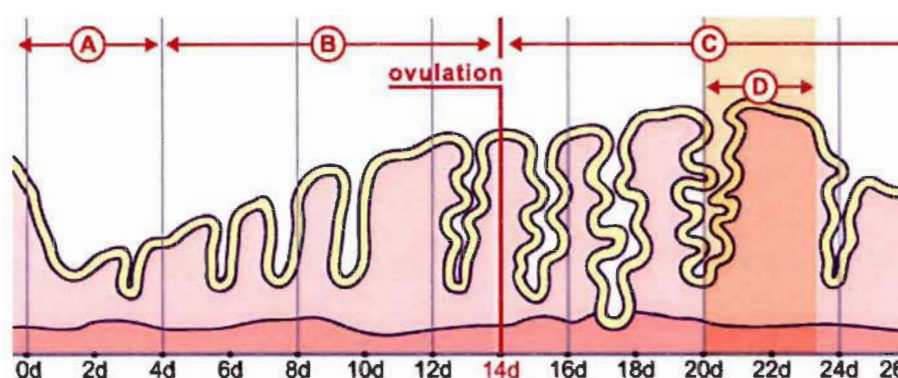


FIGURE 1.2 : Représentation des différentes phases du cycle menstruel chez la femme où A représente la période des menstruations; B, la phase proliférative; C, la phase sécrétoire et D, la fenêtre d'implantation (www.embryology.ch).

1.3.1.2 Le cycle oestral chez la rate

Chez les rongeurs, le cycle oestral est différent, car il n'y a pas de menstruation. Le cycle est divisé en quatre phases : le proestrus, l'oestrus, le métrus et le diestrus. Le proestrus correspond à la phase de maturation folliculaire. Durant cette phase, l'œstrogène sécrétée par les ovaires est élevée. Cette période peut durer plus de 60 heures et ce n'est qu'à la fin de celle-ci que peut se produire l'accouplement. On peut remarquer qu'à la fin de cette phase, le niveau d'œstrogène augmente suivi par un pic de LH (voir figure 1.3) juste avant le début de l'oestrus (Levasseur et al. 2001). L'estradiol produit par le(s) follicule(s) mature(s) est responsable de la décharge ovulatoire de LH/FSH (Levasseur et al. 2001). La croissance des follicules provoque également un

hausse des concentrations d'inhibine A. L'inhibine est une glycoprotéine produite par les cellules de la *granulosa* qui est impliquée dans le contrôle de la sécrétion de FSH (Luisi et al. 2005). Elle est présente dans la circulation sous deux isoformes (inhibine A et B). L'augmentation de la progestérone qui suit le pic d'œstrogène durant le proestrus est responsable de l'apparition de l'oestrus et a un rôle important dans l'ovulation (Levasseur et al. 2001). L'oestrus est la période du cycle oestral où se produit l'ovulation et a une durée de 10 à 20 heures. Quant à la période du métestrus, sa durée approximative est de 8 heures. Lors du métestrus, il y a production de progestérone, organisation fonctionnelle du corps jaune et l'endomètre s'épaissit. La dernière phase du cycle oestral chez la rate est le diestrus. Le diestrus correspond à la phase lutéale, laquelle se déroule sur une période de 6 heures environ. Durant cette phase, le niveau de progestérone est bas et le niveau d'estradiol remonte progressivement jusqu'au début du proestrus. Les corps jaunes ne sont pas fonctionnels et régressent lentement (Levasseur et al. 2001).

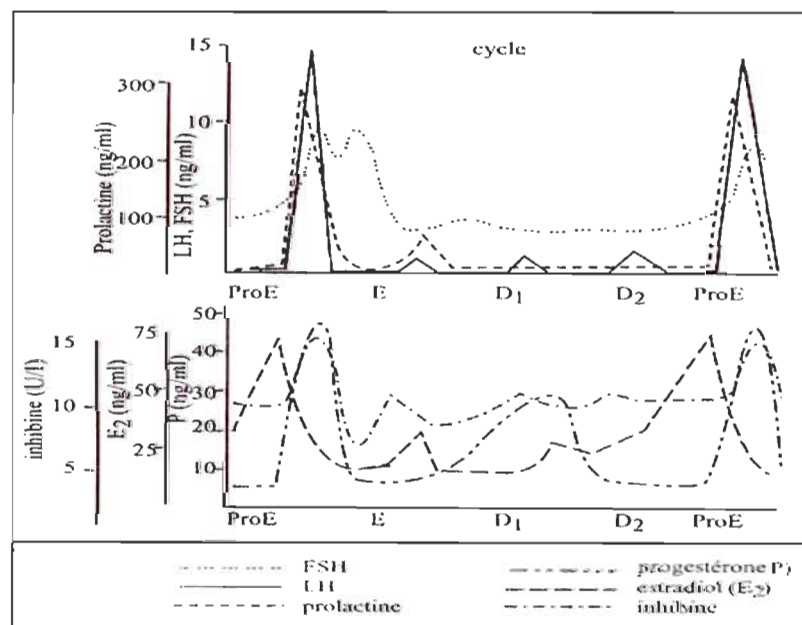


FIGURE 1.3 : Profils hormonaux chez la rate au cours du cycle oestral. Le début du proestrus (ProE) est caractérisé par une élévation d'estradiol suivi d'une hausse de progestérone. Cette augmentation de progestérone est responsable du changement de phase vers l'oestrus (E). Un pic de FSH/LH peut être observé vers la fin de proestrus. Dans cette figure, le diestrus est divisé en deux parties, soit D1 et D2. La phase D1 correspond au métestrus (Levasseur et al. 2001).

Chez la rate, les variations d'hormones au cours du cycle oestral entraînent des changements au niveau de l'épithélium vaginal. La muqueuse vaginale se renouvelle à chaque cycle. Chez la rate, chaque stade possède des caractéristiques épithéliales qui lui sont propres et par conséquent, il est possible de déterminer le stade exact de la femelle en procédant à des frottis vaginaux. Par exemple, on reconnaît l'oestrus à la forte présence de mort cellulaire épithéliale et le diestrus à la présence de plusieurs cellules de petites tailles (voir figure 1.4).

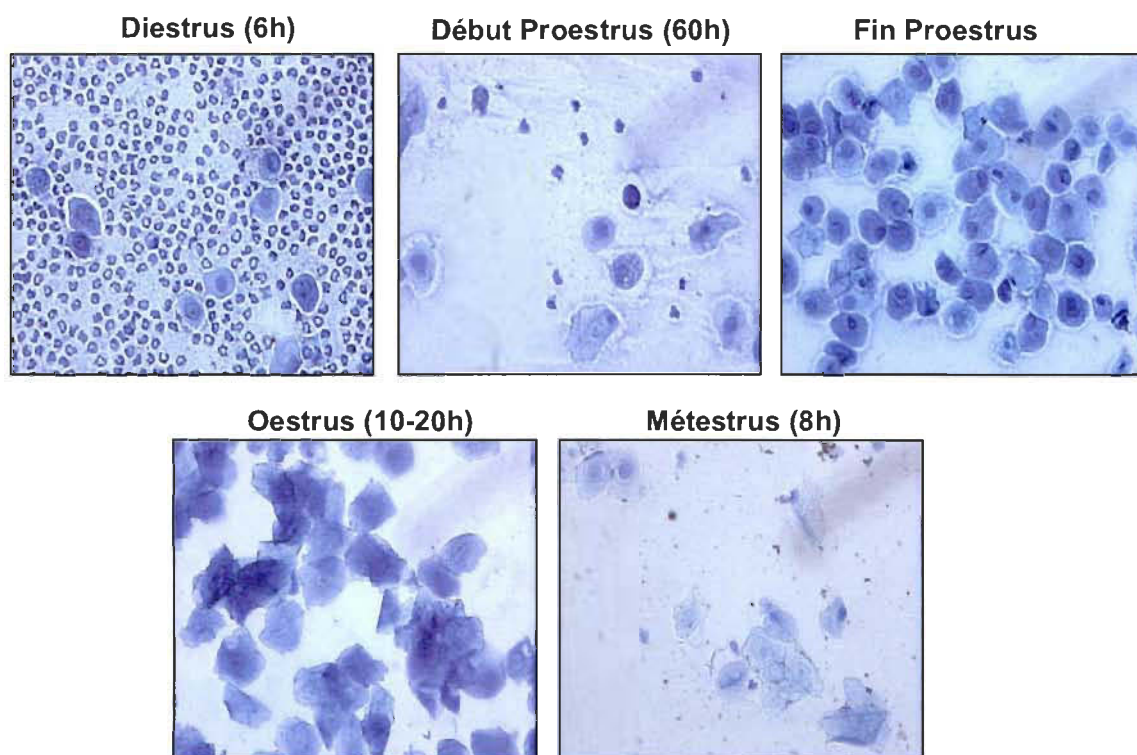


FIGURE 1.4 : Frottis vaginaux de la rate aux différents stades du cycle oestral (diestrus, proestrus, oestrus et métestrus). Le proestrus est caractérisé par la présence de cellules épithéliales rondes. Suite à la hausse de FSH/LH, on peut observer de plus en plus de cellules plates kératinisées (passage vers l'oestrus). Quant aux métestrus et diestrus, on observe la présence de diverses cellules (kératinisées, rondes et polynucléaires).

1.3.2 La gestation

La gestation chez la rate est plus courte que chez la femme où celle-ci dure environ 9 mois. Chez la rate, la gestation ne dure en moyenne que 22 jours et est souvent divisée en deux périodes, c'est-à-dire le début de gestation (« early ») et la fin de gestation (« late »). En début de gestation, on retrouve l'étape de l'implantation embryonnaire suivie de la décidualisation qui se produit au jour 5,5 chez la rate. Lors de la décidualisation, il y a formation de cellules déciduales, lesquelles représentent une réserve importante de glycogène pour l'embryon. Ces cellules subissent une importante régression vers le jour 14 de la gestation. Puis, en toute fin de gestation, on retrouve la période de parturition, c'est-à-dire l'accouchement. La gestation de la rate ainsi que ses principales étapes sont schématisées dans la figure 1.5 ci-dessous.

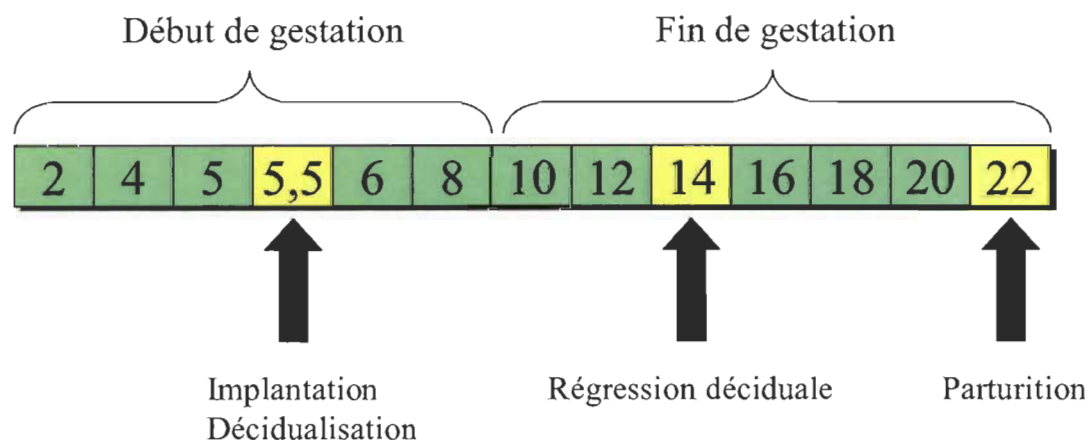


FIGURE 1.5 : Schématisation de la gestation chez la rate et de ses principales étapes. L'implantation se produit entre le jour 5 et 6 de la gestation. L'implantation déclenche immédiatement le processus de décidualisation. La régression des cellules déciduales se produit vers le jour 14 de la gestation et la parturition, vers le jour 22 chez la rate.

1.3.3 Le blastocyste

Suite à la fécondation, le blastocyste doit atteindre le site d'implantation. Le blastocyste est entouré d'une zone pellucide ce qui permet de maintenir les blastomères ensemble et d'assurer une filtration adéquate pour maintenir un milieu périvitellin

adéquat. Les divisions cellulaires qui se produisent alors sont asynchrones et il y a formation de deux populations cellulaires de tailles différentes. Les plus petites constituent le bouton embryonnaire (ICM, Inner Cell Mass) et les grandes : les trophoblastes (Levasseur et al. 2001). Ces trophoblastes comprennent deux couches dont l'une interne et l'autre externe. La couche interne est composée de cytotrophoblastes et l'externe, de syncytiotrophoblastes. Lorsque le blastocyste prend de l'expansion suite à l'accumulation de liquide, la zone pellucide s'amincit pour finalement se rompre juste avant l'implantation embryonnaire.

1.3.4 L'implantation embryonnaire

Comme il a été mentionné plus haut, l'implantation se déroule au jour 5,5 de la gestation chez la rate. Cette période correspond à l'attachement du blastocyste à l'épithélium luminal utérin où des échanges directs entre l'embryon et la mère se produisent. Ces échanges sont médiés par plusieurs molécules dont des facteurs de croissance, les hormones stéroïdiennes, les métalloprotéinases et les prostaglandines (Sharkey et al. 2003). L'implantation est également caractérisée par la présence d'apoptose (mort cellulaire programmée) au niveau des cellules épithéliales de l'utérus aux sites d'implantation (Joswig et al. 2003).

1.3.4.1 L'implantation chez la rate

Suite à la fécondation, les blastocystes quittent l'oviduct et se retrouvent dans la cavité des cornes utérines. Les blastocystes sont distribués tout le long des cornes utérines grâce au mouvement du myomètre. La période de réceptivité du tissu utérin à l'implantation est limitée et se situe entre le jour 4 et 5 de la gestation chez les rats et les souris (Sharkey et al. 2003; Tranguch et al. 2005). Chez la souris, la période de réceptivité de l'utérus qui permet l'implantation est régulée par l'œstrogène et la progestérone (Huet-Hudson et al. 1989). Les cellules endothéliales de l'utérus commencent à proliférer à partir du troisième jour de la gestation jusqu'au moment de l'implantation embryonnaire. À partir de ce moment, la prolifération cellulaire revient à

son niveau basal entre les sites d'implantation et se poursuit au niveau des sites d'implantation. Cette observation tend à démontrer que la prolifération cellulaire endothéliale est contrôlée du côté maternel avant l'implantation et par la suite, par l'embryon lui-même.

La première étape de l'implantation est la fixation de l'embryon sur l'épithélium luminal de l'utérus. L'implantation de l'embryon ne se produit pas de la même façon selon les différentes espèces. La profondeur de la pénétration du trophoblaste dans l'endomètre n'est pas la même selon les espèces, ce qui entraîne la formation de différents types histologiques de placenta (Levasseur et al. 2001). Chez certaines espèces comme les ruminants, le blastocyste reste en surface de l'épithélium et ne pénètre pas l'épithélium utérin. Dans ce cas, la placentation est dite épithéliochoriale (voir figure 1.7), car elle ressemble davantage à une fixation qu'à une nidation. Chez le rat et certains mammifères tels l'humain, la placentation est dite hémochoriale, ce qui signifie qu'il y a des échanges directs entre le sang maternel et l'embryon suite à l'invasion du blastocyste dans l'endomètre utérin (voir figure 1.7). La réussite de l'implantation dépend d'une bonne communication entre le tissu utérin et l'embryon (Paria et al. 2000; Paria et al. 2001; Paria et al. 2002).

La première étape caractérisant l'implantation est l'attachement du blastocyste aux cellules épithéliales lumineuses de l'utérus. Chez les rats, cette étape est suivie par l'attachement du blastocyste trophoctoderme (trophoblastes) à l'épithélium luminal au pôle antimesométrial de l'utérus. Selon les espèces, la position du blastocyste et l'orientation du bouton embryonnaire diffèrent. Chez les rats et les souris, l'implantation est dite excentrée, car il y a formation d'une chambre d'implantation enfermant le blastocyste. Chez l'humain, l'implantation est dite latérale (voir figure 1.6). Les cellules en surface du blastocyste sont des trophoblastes. Les trophoblastes adhèrent directement à l'épithélium luminal utérin avant de pénétrer dans l'épithélium (Enders et al. 1972). En effet, suite à l'attachement, il y a rupture de la membrane basale et invasion de l'embryon dans le stroma (Reinius 1967). Au même moment, plusieurs changements

sont initiés dans l'utérus et il y a une augmentation de la perméabilité vasculaire dans la région du site d'implantation de l'embryon.

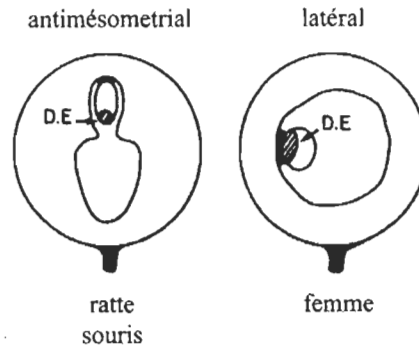
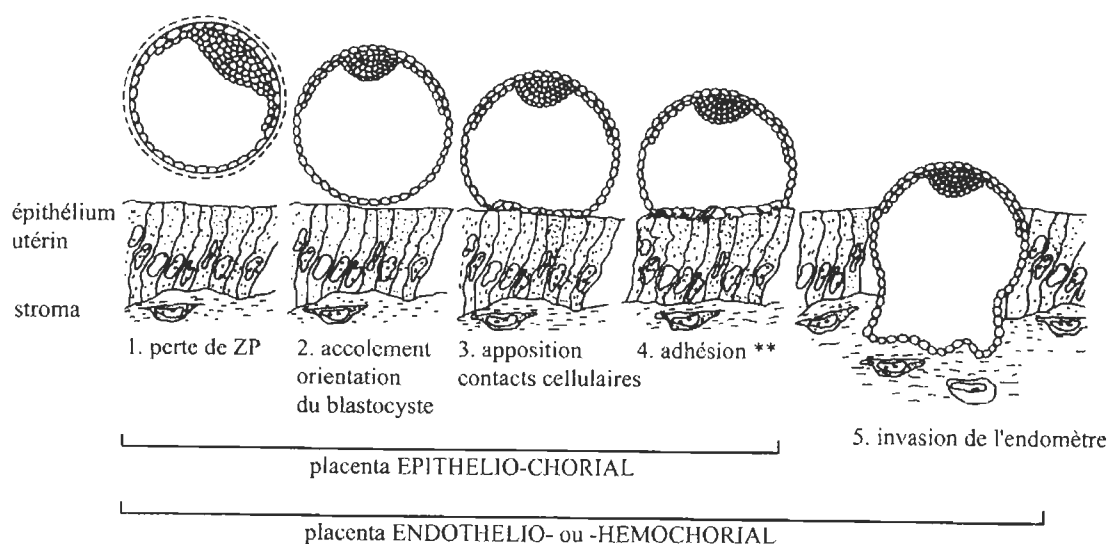


FIGURE 1.6 : Schéma démontrant la position du blastocyste dans la cavité utérine, l'orientation du disque embryonnaire (D.E.) par rapport au plan mésométrial qui est dirigé vers le bas de la figure. Chez le rat, l'implantation est excentrée et se produit au pôle antimésométrial tandis que chez la femme, l'implantation est latérale.

Durant la phase d'apposition, il y a une interdigitation progressive des microvilli et il y a une augmentation de l'interaction entre la membrane du blastocyste et l'endomètre. La progestérone permettrait de maintenir cette apposition et l'œstrogène permettrait l'augmentation de ce rapprochement et la progression de l'attachement (Abrahamson et al. 1993). L'étape qui s'en suit est l'adhésion des trophoblastes dans la région apicale des cellules épithéliales. Il y a alors formation de jonctions entre les cellules adjacentes. Pendant que l'apposition se poursuit, les premiers signes de déciduisation apparaissent dans le stroma subjacent et il y a alors présence de mort cellulaire au niveau des cellules épithéliales. Les cellules épithéliales mortes sont phagocytées par les trophoblastes. Les macrophages jouent également un rôle important dans l'élimination des cellules mortes durant le processus d'implantation. Ces derniers représentent entre 20 et 30% des cellules déciduales au site d'implantation. De plus, les macrophages ont pour fonction d'éliminer les trophoblastes en processus de mort cellulaire afin de prévenir la libération de composantes intracellulaires des trophoblastes dans le but d'éviter un rejet du fœtus par le système immunitaire de la mère (Mor G. et Abrahams V.M. 2003)

L'attachement du blastocyste à l'épithélium est graduel. Chez plusieurs espèces telles le rat, la souris et le hamster, il y a tout d'abord une interdigitation des microvillosités des trophoblastes externes et des cellules épithéliales utérines, ce qui assure une adhésion primaire (Neil 1994; Mayer et al. 1967; Enders et al 1969; Enders 2000; Enders et al. 1971; Tachi et al. 1970). Ensuite, l'adhésion est renforcée suite à une modification de la forme de l'une des deux surfaces. Finalement, il y a formation de jonctions entre les trophoblastes et les cellules épithéliales. Suite à la formation de ces jonctions, l'embryon ne peut plus être éliminé par un simple lavage.

Avant de pouvoir pénétrer l'épithélium, les trophoblastes doivent adhérer aux cellules épithéliales. Durant l'implantation chez les rats et les souris, les trophoblastes restent à la surface de l'épithélium une journée et au niveau de la *lamina* basale, une autre journée (Parr et al. 1987).



Le disque embryonnaire est arbitrairement orienté au pôle opposé au site d'implantation.
 ** Ce stade est la phase ultime de l'implantation dans les espèces à placentation épithélio-choriale.

FIGURE 1.7 : Schéma des différentes phases de l'implantation. Cette figure décrit l'implantation en 5 étapes. Il y a tout d'abord perte de la zone pellucide (ZP). Ensuite, le blastocyste se positionne, il y a accollement puis apposition à la surface de l'endomètre. Le blastocyste adhère à la surface de l'endomètre et dans le cas d'une placentation hémochoriale, il y a invasion de l'endomètre (Levasseur et al. 2001).

La voie de la PI3K/Akt serait impliquée dans la différenciation et la migration des trophoblastes (Kamei et al. 2002). Cette voie de signalisation serait présente et fonctionnelle durant le développement embryonnaire précédant l'implantation chez les rongeurs. L'inhibition de cette voie diminuerait l'éclosion de l'embryon lequel est requis pour la réussite de l'implantation (Riley et al. 2005).

1.3.4.2 La période de l'implantation embryonnaire chez la femme

Chez l'humain, le syncytiotrophoblaste sécrète l'hCG (hormone gonadotrophine chorionique humaine). Cette hormone est essentielle au déroulement de la gestation chez la femme, car elle permet la transformation du corps jaune cyclique en corps jaune gravidique. Ce dernier assure le maintien de la sécrétion de progestérone durant les six premières semaines de la grossesse. La fécondation chez l'humain se produit dans les trompes de Fallope 24 à 48 heures après l'ovulation. L'implantation se produit vers le 6^{ième} et le 7^{ième} jour suivant la fécondation. Pendant quelques semaines après l'implantation, la gestation humaine est dépendante de la présence d'un corps jaune fonctionnel. La progestérone est une hormone importante dans le maintien de la grossesse pendant cette période et l'hormone hCG est nécessaire pour un fonctionnement normal du *corpus luteum*. L'hormone hCG peut être détectée environ 8 à 10 jours après la conception dans la circulation systémique (Sharkey and Smith 2003). La sécrétion d'hCG par le trophoblaste et ensuite le syncytiotrophoblaste permet de maintenir la fonction lutéale (Levasseur et al. 2001). Il a été démontré que l'hCG stimule la synthèse de progestérone par le tissu lutéal *in vitro* (Levasseur et al. 2001). Selon certaines observations, l'embryon pourrait influencer les fonctions du *corpus luteum* au début de la gestation (Hagström et al. 1996). En effet, des études menées sur des grossesses hétérotopiques ont révélé que l'embryon additionnel augmente l'activité du *corpus luteum*, laquelle est comparable à l'activité retrouvée dans les cas de jumeaux. De plus, un fait intéressant est qu'en début de grossesse, il y a une prédominance des récepteurs de la PGE2 comparé aux récepteurs de la LH et de l'hCG sur les cellules lutéales (Niswender et al. 1991); la PGE2 étant sécrétée par des embryons de 7 jours (Holmes et al. 1990).

1.3.5 La décidualisation

Chez les rongeurs, l'implantation entraîne des changements organisationnels ainsi que fonctionnels importants dans le stroma et déclenche un autre processus nommé décidualisation. La décidualisation se caractérise entre autres par une augmentation de la perméabilité vasculaire de l'utérus, la prolifération des cellules stromales et leur différenciation en cellules déciduales (voir figure 1.8). En effet, une augmentation de la perméabilité a été observée lors de l'implantation chez plusieurs espèces dont le rat (Psychoyos 1960), le porc (Keys et al. 1986) ainsi que le mouton (Boshier et al. 1970). Des études ont démontré que les prostaglandines jouent un rôle important dans la médiation des changements vasculaires de l'utérus et la décidualisation dans son ensemble (Kennedy 1983; Kennedy 1985). Les prostaglandines PGE2 et PGI2 semblent être impliquées dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire durant l'implantation et seraient essentielles au processus de décidualisation (Pampfer et al. 1999).

Deux zones déciduales sont formées lors de la gestation, une zone déciduale primaire sur le côté antimésométrial de l'utérus et une seconde zone déciduale nommée décidue antimésométriale. Le matin du jour 6 de gestation chez le rat, l'absence de capillaires sanguins autour du blastocyste révèle la présence d'une zone avasculaire autour de ce dernier. Cette région est nommée la zone déciduale primaire. Deux hypothèses ont été suggérées pour expliquer ce phénomène : pour déclencher l'invasion des trophoblastes ou encore pour empêcher le rejet par le système immunitaire de la mère (Abrahamson et al. 1993; Tarachand 1986). Cette région est entourée par de gros vaisseaux sanguins et par la présence de leucocytes.

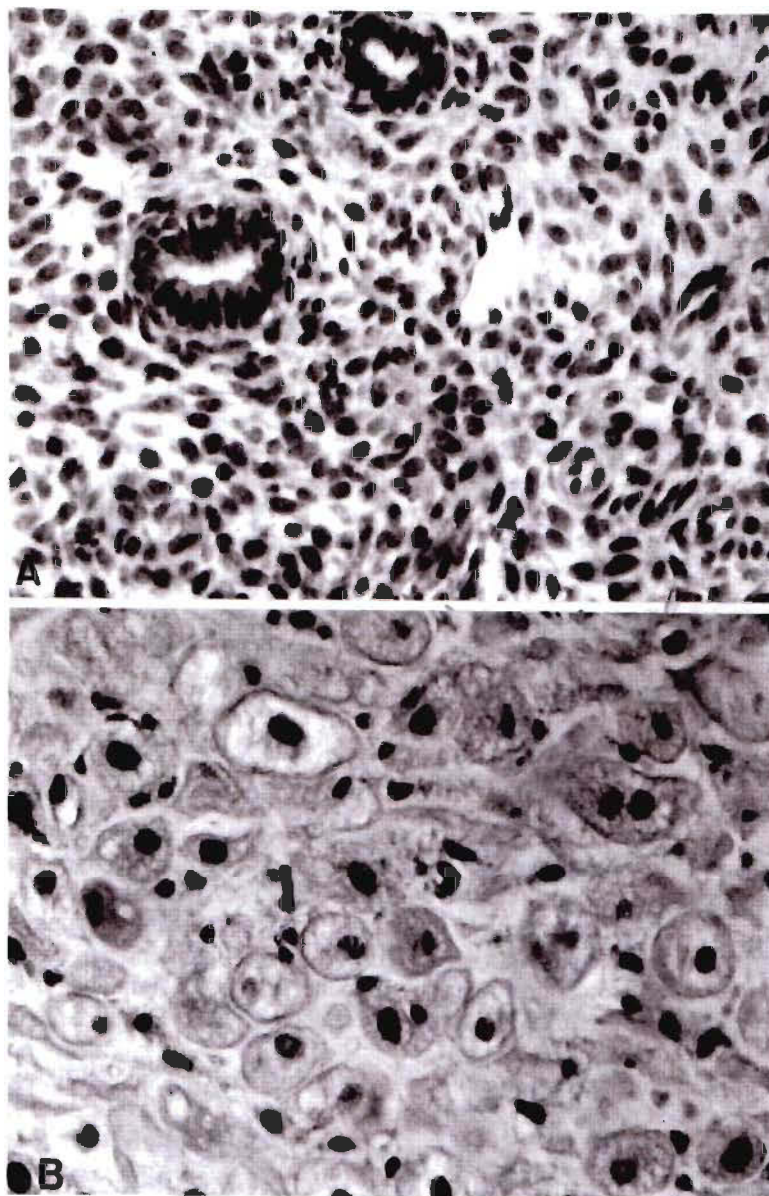


FIGURE 1.8 : A) Stroma d'un endomètre humain en phase proliférative; B) Stroma lors de la décidualisation en début de gestation. Les cellules stromales ont subi des modifications morphologiques importantes et renferment une quantité importante de glycogène. Grossissement 400X (Levasseur et al. 2001).

La décidue primaire avasculaire se forme dans la région subépithéliale et est rapidement pénétrée par les trophoblastes. Les trophoblastes envahissent le tissu utérin et atteignent les vaisseaux sanguins de la mère dans la région antimésométriale et créent un système d'irrigation dit primitif autour de l'embryon. La décidue primaire devient progressivement entourée d'une seconde couche déciduale qui se dirige petit à petit vers

le pôle mésométrial. La seconde zone déciduale régresse à partir du jour 14 de la gestation chez le rat. Chez les rats et les souris, durant cette étape, des changements cytosoliques importants apparaissent et des modifications surviennent au niveau des jonctions cellulaires entre les cellules déciduales. Ces modifications entraînent un remodelage de la zone péri-embryonnaire (Pampfer et al. 1999). Durant cette période, la taille et le poids de l'utérus augmentent.

Contrairement aux rongeurs, chez l'humain une décidualisation se produit à chaque cycle menstruel. Les cellules déciduales ont un rôle durant la gestation et lorsqu'il n'y en a pas, ces cellules sont impliquées dans la dégradation de l'endomètre lors des menstruations (Tarachand 1986). La décidualisation commence dans la zone antimésométriale (grandes cellules polyploïdes) (Gu et al. 1994). En deux jours, elle prend place dans la région mésométriale donnant naissance à des cellules plus petites et moins différenciées. Quand le blastocyste s'implante et commence à grossir, il y a une régression et une réorganisation du tissu décidual. La décidue antimésométriale, qui se forme en premier, dégénère et se transforme en une fine couche de tissu, la décidue capsularis, laquelle est perdue avec le placenta lors de la parturition. La mort cellulaire prend place plus tard dans la décidue mésométriale, le site éventuel de la décidue basalis qui rapetisse avec la progression de la grossesse (Tarachand 1986).

La décidualisation aurait un rôle entre autres dans le contrôle de l'invasion trophoblastique et aurait un rôle immunomodulateur ainsi qu'un rôle dans le transfert des nutriments (Abrahamsohn et al. 1993; Loke et al. 1995; Fazleabas et al. 2002). Les cellules déciduales sont importantes pour le maintien de la gestation, car elles représentent une réserve de glycogène pour l'embryon jusqu'à l'établissement du placenta. Le placenta est un organe autonome et transitoire. Son rôle est de nourrir, oxygéner et d'éliminer les déchets tels l'urée et le CO₂. Chez certaines espèces, le placenta possède des fonctions endocrines nécessaires au bon déroulement de la gestation ainsi qu'à la croissance du fœtus (Malassiné et al. 2000).

1.3.6 La régression déciduale

Comme il a été mentionné précédemment, durant la gestation, l'utérus subit plusieurs changements morphologiques et physiologiques afin de permettre le développement de l'embryon (Gu et al. 1994). La transformation des cellules stromales en cellules déciduales en est un exemple. La régression des cellules déciduales de la zone déciduale secondaire se produit vers le jour 14 chez la rate. Les études effectuées jusqu'à présent tendent à démontrer que la mort cellulaire qui apparaît au niveau de ces cellules serait l'apoptose (mort cellulaire programmée) (Joswig et al. 2003; Shooner et al. 2005). En effet, une étude réalisée au sein de notre laboratoire a démontré la présence de la caspase-3 clivée durant la régression déciduale chez la rate (Shooner et al. 2005), cette enzyme étant une protéine clé dans le déclenchement de l'apoptose. L'apoptose serait initiée tout d'abord au niveau de la région antimésométriale puis ensuite progresserait vers la région mésométriale (Gu et al. 1994). Les mécanismes impliqués dans le déclenchement de l'apoptose ne sont pas entièrement connus pour l'instant. Chez le rat, des études ont démontré l'implication des différents isoformes des TGF- β (« transforming growth factor ») (Shooner et al. 2005), et l'implication de la protéine Akt (Dery et al. 2003). En effet, TGF- β 1 et TGF- β 2 ont été détectés tout au long de la gestation et leur niveau était particulièrement élevé durant les phases où il y avait présence d'apoptose comme la régression déciduale (Shooner et al. 2005). Quant à Akt, des résultats obtenus par notre laboratoire (Dery et al. 2003) suggèrent que l'augmentation de l'expression d'Akt et de son activité en réponse à l'estradiol permettrait de protéger les cellules endométriales de l'apoptose et induirait la prolifération cellulaire endométriale. De plus, il a été montré que l'inhibition de l'activité d'Akt mène à l'activation de la caspase-3 et à l'apoptose des cellules endométriales (Dery et al. 2003).

1.3.7 La parturition

La parturition est la dernière étape de la gestation. Chez l'humain, cette étape est caractérisée par 5 processus physiologiques : la rupture membranaire, la dilatation

cervicale, la contraction du myomètre, la séparation du placenta et finalement l'involution utérine (Olson 2003). L'implication des prostaglandines dans le processus de parturition a été évoquée suite à différentes études et selon ces dernières, les prostaglandines joueraient un rôle principal dans l'initiation et le déroulement du travail chez plusieurs mammifères (Challis et al. 2002). Il a été démontré entre autres que les PGs induisent la contraction du myomètre (Challis et al. 2002) et seraient impliqués dans la séparation du placenta, plus particulièrement les prostaglandines PGE₂ et PGF₂α. Chez les moutons, les concentrations de PGE₂ augmentent dans la circulation du fœtus de façon progressive au cours des 15-20 derniers jours de la gestation et quant à PGF₂α, elle augmente dans la circulation de la mère à la toute fin de la gestation en même temps que la concentration d'œstrogène libre. Selon ces observations, une hypothèse a été émise du fait que ces deux PGs seraient régulées par différents mécanismes (Gyomerey et al. 2000).

1.4 LES HORMONES STÉROÏDIENNES

L'œstrogène et la progestérone sont des hormones ovariennes clés produites par le follicule lors de son développement dans l'ovaire. Ces deux hormones sont induites à des moments précis lors du cycle menstruel, ainsi que durant des étapes précises de la gestation.

1.4.1 L'œstrogène

Les œstrogènes sont un groupe d'hormones stéroïdiennes qui dérivent du cholestérol et de la prégnénolone. Ces derniers sont transformés en androstènedione et testostérone qui sont des précurseurs des estrogènes. Les trois principaux œstrogènes sont l'estradiol, l'estriol et l'estrone. Les œstrogènes sont synthétisés en grande partie dans les ovaires par l'activité de l'aromatase par les cellules granulosas et, lors de la gestation, par le placenta. Le follicule préovulatoire possède des niveaux très élevés d'estradiol intrafolliculaire, ce qui est dû principalement à la grandeur de la population de cellules granulosas et sa capacité d'aromatation d'androgène (Drummond 2006). Les

estrogènes agissent via des récepteurs nucléaires ($ER\alpha$ et $ER\beta$) afin de modifier la transcription de certains gènes. L'isoforme β est la forme prédominante dans l'ovaire. Différents rôles ont été identifiés pour les deux isoformes : $ER\alpha$ inhiberait l'ovulation et la croissance utérine, tandis que $ER\beta$ stimulerait la croissance folliculaire et augmenterait le nombre d'oocytes relâchés à l'ovulation (Drummond 2006).

Durant le cycle oestral, la synthèse d'estrogènes varie. Chez la femme, la concentration d'estrogène atteint un maximum juste avant l'ovulation. Chez la rate, des variations d'estrogènes ont également été observées et sa concentration est maximale juste avant l'oestrus (voir 1.3.1). Les œstrogènes possèdent entre autres une action mitotique et seraient impliquées entre autres dans le cancer du sein.

1.4.2 La progestérone

La progestérone est également une hormone synthétisée principalement au niveau de l'ovaire. La progestérone provient de la transformation du cholestérol en prégnénolone puis en progestérone sous l'action de deux enzymes (déshydrogénase et isomérase). La concentration de progestérone varie au cours de cycle oestral (voir la section 1.3.1). Lors de la gestation, elle est sécrétée par le corps jaune et joue un rôle important dans le maintien de la gestation et aussi par le placenta (Levasseur et al. 2001). Les membranes fœtales (amnion et chorion) et la décidue sont des tissus cibles de la progestérone. Des études ont confirmé la présence dans l'expression des récepteurs de la progestérone au niveau de la décidue (Goldman et al. 2005). La progestérone agit via des récepteurs nucléaires, lesquels sont présents au niveau de l'endomètre utérin. La réponse suite à la sécrétion de progestérone requiert l'expression des récepteurs de progestérone (PRs) fonctionnels. Les récepteurs de progestérone les mieux caractérisés sont ceux appartenant à la super famille des récepteurs nucléaires, lesquels agissent comme facteur de transcription. Il y a deux principaux isoformes des PRs nucléaires, soit PRA et PRB, qui sont générés à partir du même gène. Certaines études ont révélé que les souris n'exprimant un PRB fonctionnel ont une gestation normale, tandis que les souris sans PRA sont infertiles, ce qui laisse suggérer que PRB ne semble pas être essentiel

pour le maintien de la gestation chez la souris. Quant à PRA, ce récepteur semble médier l'action de la progestérone dans l'utérus de la souris durant la gestation (Mulas-Jericevic et al. 2000; Mulas-Jericevic et al. 2003).

1.5 LES PROSTAGLANDINES

Les prostaglandines ont fait l'objet des plusieurs études au cours des dernières décennies. La première prostaglandine a été isolée en 1957 chez le bovin (The lancet 1973). Les prostaglandines exercent des actions diverses dans plusieurs tissus et cellules. Elles sont impliquées dans plusieurs processus physiologiques, mais aussi dans l'apoptose, la différenciation cellulaire et l'oncogenèse en plus d'être impliquées dans l'homéostasie vasculaire (Narumiya et al. 1999). Les prostaglandines ont également été détectées dans plusieurs parties de l'organisme dont le fluide menstruel et l'endomètre. Cette découverte a amené l'hypothèse de l'implication des prostaglandines au niveau des fonctions reproductrices humaines. Plusieurs études ont révélé certains rôles clés des prostaglandines pendant la gestation et c'est pourquoi les prostaglandines sont utilisées au niveau clinique. Par exemple, les PGs sont utilisées aujourd'hui en clinique pour induire le travail chez les femmes, mais aussi l'avortement (The lancet 1973). De plus, des expériences réalisées sur des rates et des lapines démontrent que l'indométacine, qui est un inhibiteur des COXs, inhibe l'ovulation (Dennefors et al. 1983; Sherman 1984). Il a également été démontré que le blocage de la synthèse des prostaglandines par l'indométacine avant ou durant l'implantation entraîne une inhibition ou un délai de celle-ci, ou encore une diminution du nombre de sites d'implantation avec une diminution du tissu décidual (Shah et al. 2005).

1.5.1 La synthèse des prostaglandines

Les prostaglandines sont des médiateurs lipidiques qui dérivent de l'acide arachidonique (acide 5, 8, 11, 14-cis eicosatetraénoïque). L'acide arachidonique est un acide gras insaturé de 20 carbones présent dans la membrane cellulaire et est habituellement estérifié à la position SN-2 des phospholipides. Les phospholipides sont

clivés directement par l'action catalytique de la phospholipase A2 ou indirectement par l'action de la phospholipase C (PLC) (Challis et al. 2002), ce qui permet alors la libération de l'acide arachidonique. C'est la première étape de la synthèse des prostaglandines. En effet, l'acide arachidonique peut alors être transformé en lipides bioactifs tels les prostaglandines (Williams et al. 1999), les leucotriènes et les lipoxines. La synthèse des PGs implique différentes enzymes synthases qui convertissent PGH2 (métabolite des COX) en prostaglandines (PGE2, PGF2 α , PGD2, PGI2) et en thromboxane A2 (TXA2). L'action des PGs est de type paracrine et/ou autocrine (Zakar T. et Hertelendy F. 2001). Elles se lient à des récepteurs membranaires pour stimuler ou inhiber la synthèse de seconds messagers. Les PGs ne sont pas emmagasinées, mais excrétées aussitôt produites (la majorité des prostaglandines est métabolisée lors d'un seul passage dans la circulation sanguine). Les prostaglandines G, PGH et PGI sont chimiquement instables. Elles ont une demi-vie qui va de 30 secondes à quelques minutes et sont dégradées en produits inactifs. Les autres prostaglandines sont stables, mais elles sont métabolisées très rapidement (Narumiya et al. 1999). Les prostanoïdes actifs primaires (PGs et TXA2) peuvent être inactivés soit de façon spontanée comme la PGI2 et TXA2 ou métaboliquement, comme c'est le cas pour PGE2 et PGF2 α qui sont inactivé par l'enzyme 15-hydroxy-prostaglandin déhydrogénase (PGDH) (Zakar T. et Hertelendy F. 2001). Puisque leur demi-vie est relativement courte, le dosage des PGs est difficile et c'est pourquoi les chercheurs ont recours au dosage de leurs métabolites respectifs.

Les prostaglandines sont identifiées par les lettres et dans certains cas, un chiffre suit cette lettre afin d'indiquer le nombre de double liaisons présentes au sein de la molécule comme par exemple PGE₂. L'inscription α ou β indique quant à elle la configuration (cis ou trans) du groupement hydroxyle (OH) sur le carbone en position 9 de la molécule (Jensen et al. 1987).

L'acide arachidonique est d'abord converti en prostaglandine G2 et ensuite en prostaglandine endoperoxyde (PGH2) par une enzyme nommée cyclooxygénase (COX). COX est une protéine membranaire qui possède des propriétés cyclooxygénases et

peroxydases et est composée de trois unités: un domaine de facteur de croissance épidermal, un motif de liaison membranaire et un domaine enzymatique. COX est une enzyme qui peut catalyser deux types de réactions soit une réaction d'oxydation et de réduction. Cette enzyme existe sous deux isoformes : COX-1 et COX-2. COX-1 a été purifié pour la première fois à partir de glandes vésiculaires de bovins en 1976 (Miyamoto et al. 1976). COX-1 est connue comme étant une enzyme constitutive qui est exprimée dans la majorité des tissus. COX-2 est, quant à elle, considérée comme une enzyme inductible. En effet, les niveaux de COX-2 varient d'un tissu à l'autre et son expression peut être induite par une multitude de stimuli qui inclut des facteurs de croissances, des cytokines, des hormones et des stimuli reliés à l'inflammation. COX-2 se retrouve en grande quantité sur l'enveloppe nucléaire d'une cellule contrairement à COX-1. Selon une étude réalisée par Swinney et son équipe (Swinney et al. 1997), COX-2 pourrait oxygéner de plus petites quantités d'acide arachidonique de façon plus efficace que COX-1.

Les protéines COX-1 et COX-2 présentent une homologie d'environ 60% et sont encodées par deux gènes différents localisés sur deux chromosomes distincts (Hla et al. 1999). L'homologie entre les séquences de ces isoformes entre les différentes espèces se situe entre 85 et 90%. Les deux isoformes présentent une importante différence au niveau de leur site actif, qui est caractérisée par la substitution d'une isoleucine en position 523 chez COX-1 pour une valine chez COX-2 (Simmons et al. 2004). De plus, 17 acides aminés sont absents dans la région N-terminale de COX-2 comparé à COX-1. Malgré certaines différences, l'affinité et la capacité de COX-1 et COX-2 à convertir l'acide arachidonique en PGH₂ est très similaire (Challis et al. 2002).

Plusieurs études ont démontré l'importance des prostaglandines au niveau de l'implantation embryonnaire. Il a été démontré que chez des souris déficientes en COX-1, celles-ci demeuraient fertiles, mais éprouvaient des problèmes lors de la parturition tandis que l'absence de COX-2 affectait la fertilité et entraînait des anomalies durant l'ovulation, la fécondation, l'implantation ainsi que la décidualisation (Matsumoto et al. 2001). Certaines études ont suggéré une possible compensation par COX-2 chez les

souris COX-1 $-/-$, ce qui permettrait entre autres une implantation normale (Wang et al. 2005). D'autres études suggèrent que l'expression de COX-2, mais non COX-1, est essentielle pour la réussite de l'implantation chez les souris (Lim et al. 1997).

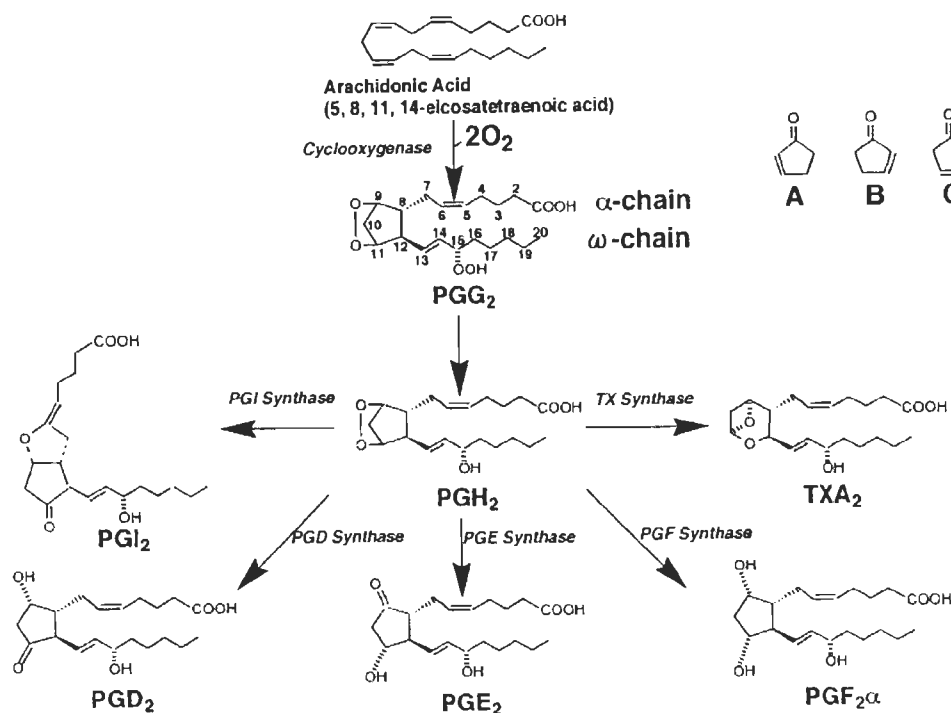


FIGURE 1.9 : Biosynthèse des prostaglandines (Narumiya et al. 1999). L'acide arachidonique est tout d'abord libéré via le clivage des phospholipides et converti en prostaglandine G₂ puis en prostaglandine endoperoxyde (PGH₂) par une enzyme nommée cyclooxygénase (COX). Sous l'action de différentes enzymes synthases, PGH₂ est converti en prostaglandines (PGE₂, PGF₂ α , PGD₂, PGI₂) et en thromboxane A₂ (TXA₂).

Selon des études réalisées par Chakraborty et son équipe (Chakraborty et al. 1996), le gène de COX-1 est induit dans l'épithélium utérin par un traitement à l'estrogène et la progestérone chez les souris ovariectomisées. Cependant, ce traitement n'aurait pas eu d'influence sur l'expression du gène de COX-2. Ces résultats pourraient signifier que COX-1 est influencé par les hormones ovariennes au niveau de l'épithélium utérin contrairement à COX-2 qui serait régulé principalement par le blastocyste qui s'implante.

En ce qui a trait à la parturition, des études ont révélé l'implication de COX-1, mais aussi de COX-2. L'ARN messager de COX-2 serait présent dans les membranes foetales humaines, le myomètre et la décidue (Wang et al. 2005). La concentration de COX-2 semble également augmenter au moment de la parturition chez l'humain. Des études ont révélé que l'inhibition de COX-2 diminuerait *in vitro* la contractilité de l'utérus et prolongerait la grossesse *in vivo* (Challis et al. 2002). Ces observations indiqueraient un rôle de COX-2 dans le travail lors de la parturition.

Quant aux rôles respectifs de COX-2 et COX-1 durant le cycle menstruel, selon une étude de Uotila et ses collaborateurs (Uotila et al. 2002), l'expression de COX-2, mais non celle de COX-1 est stimulée dans l'épithélium glandulaire de l'endomètre en phase proliférative et chez les cellules cancéreuses d'un adénocarcinome de l'endomètre chez l'humain (Uotila et al. 2002). Ces observations suggèrent un rôle possible de COX-2 dans la régulation de la prolifération des cellules de l'endomètre.

1.5.2 La prostaglandine F2 α (PGF2 α)

PGF2 α est synthétisée par la PGFS et agit via son récepteur FP. Ce récepteur de prostaglandines est très peu sélectif et peut lier également PGD2 ainsi que PGE2 à certaines concentrations (Hata et al. 2004). Cette prostaglandine a fait l'objet de plusieurs études dans le domaine de la reproduction au cours des dernières décennies, car PGF2 α et PGE2 sont principalement produites par l'endomètre. En effet, des études ont révélé l'implication de PGF2 α à certaines étapes du cycle oestral (Poyser 1995). PGF2 α et PGE2 augmentent à partir du début du cycle menstruel et atteignent un maximum lors des menstruations (Singh et al. 1975; Kelly et al. 1984; Rees et al. 1984). PGF2 α est impliquée dans le contrôle de la vasoconstriction dans l'endomètre durant les menstruations (Able et al. 1979). Dans le myomètre, PGF2 α stimule le muscle lisse et les vaisseaux (Rees et al. 1984). Durant les menstruations, PGE2 oppose l'effet relaxant sur le muscle lisse par PGF2 α , ce qui entraîne une diminution de l'activité myométriale et l'induction de la vasodilatation dans l'endomètre. Un déséquilibre du ratio PGF2 α /PGE2 peut entraîner des saignements excessifs (ménorragies). Des fluctuations

au niveau de la production de PGF2 α ont été associées à plusieurs problèmes au niveau des fonctions reproductrices de la femme ainsi qu'au prolongement de saignements menstruels douloureux (Rees et al. 1984).

Selon une étude réalisée par Motta et son équipe (Motta et al. 1994), la synthèse du métabolite de PGF2 α (6-keto-PGF1 α) augmenterait durant l'estrus où la concentration d'œstrogène est élevée. PGF2 α est élevée vers le milieu de la phase sécrétoire. Il a été démontré également que PGF2 α médie de façon irréversible les changements qui mènent à la rupture folliculaire au moment de l'ovulation et à la dégradation du *corpus luteum* lors de la lutéolyse. Par conséquent, cette PG serait impliquée dans l'induction de l'ovulation (Motta et al. 1994). Cette PG augmente aussi vers la fin de la phase lutéale contrairement à PGE2, qui ne varie pas significativement durant cette phase (Vijayakumar et al. 1983).

En ce qui a trait à la gestation, PGF2 α est connue pour jouer un rôle crucial dans le myomètre utérin durant la parturition en augmentant les contractions induites par l'ocytocine. Selon une étude réalisée par Sugimoto et ses collaborateurs (Sugimoto et al. 1997), les souris déficientes en récepteur FP présentent des niveaux de progestérone élevés et persistants ainsi que des complications lors de la parturition. Puisque les récepteurs de PGF2 α n'ont pas été détectés dans l'endomètre chez le rat, les effets de cette PG pourraient donc provenir de sa transformation en PGE2.

1.5.3 La prostaglandine E2 (PGE2)

PGE2 est synthétisée par PGES, qui existe sous deux isoformes, sous la forme microsomale ou cytosolique, et peut se lier à quatre récepteurs distincts : EP1, EP2, EP3 et EP4. Les effets entraînés par la synthèse de PGE2 dépendent du récepteur impliqué. D'autre part, les récepteurs EP ne présentent pas tous la même affinité pour PGE2. Les récepteurs EP3 et EP4 ont une plus grande affinité pour PGE2 que EP1 et EP2 (Abramovitz et al. 2000). Les récepteurs de PGE2 ont été détectés dans le stroma de

l'endomètre de rat et leurs concentrations augmenteraient avec la progestérone (Abramovitz et al. 2000).

Au cours du cycle menstruel, la PGE2 ne semble pas varier. Cependant, PGE2 est produite par les follicules ovariens humains et serait influencée par la progestérone. La lutéinisation du tissu folliculaire est caractérisée par la production de progestérone qui est initiée par l'AMPc. Des études ont révélés que PGE2 posséderait une action lutéinisante comme l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone hCG (Poyser 1995).

Quant à l'implication de PGE2 au cours de la gestation, selon les études réalisées par Kennedy et son équipe (Kennedy et al. 1993), PGE2 jouerait un rôle clé dans le processus de décidualisation chez les rats. Les chercheurs ont observé un rétablissement complet de la réponse utérine suite à des injections de PGE2 chez des rats auxquels la synthèse endogène de prostaglandines avait été inhibée par de l'indométacine. Contrairement à PGF2 α , PGE2 augmenterait la perméabilité vasculaire (Kennedy 1980).

1.5.4 La prostacycline (PGI2)

La PGIS est l'enzyme responsable de la transformation de PGH2 en PGI2. PGIS fait partie de la famille des cytochromes P-450 liés aux membranes cytoplasmiques et nucléaires (Wu K.K. et Liou J.Y. 2005). C'est un enzyme dite « suicide » comme les cyclooxygénases et est exprimée principalement dans les cellules endothéliales et les cellules du muscle lisse. PGIS peut être régulée entre autres par les stéroïdes, la thrombine, le TNF α et plusieurs autres cytokines inflammatoires (Wu K.K. et Liou J.Y. 2005). PGI2 est la première prostaglandine produite par les cellules endothéliales et joue un rôle primordial dans l'homéostasie vasculaire (Hata A.N. et Breyer R.M. 2004).

En ce qui a trait à son implication durant la gestation, certaines études suggèrent que PGI2, dérivant de COX-2, serait la première prostaglandine au site d'implantation (Matsumoto et al. 2001). PGI2 est très abondante dans le myomètre et agit comme un vasodilatateur ainsi qu'un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire (Fetalvero et al. 2008). La synthèse de PGI2 via COX-2 serait essentielle à l'implantation chez la souris (Lim et

al. 1997). PGI₂ participerait à l'augmentation de la perméabilité vasculaire dans la période suivant l'implantation. PGI₂ semble également jouer un rôle important durant la parturition en permettant la relaxation du segment utérin (Fetalvero et al. 2008).

1.5.5 La prostaglandine D₂ (PGD₂)

La PGDS est l'enzyme responsable de la synthèse de la PGD₂ et est présente sous deux isoformes : hématopoiétique (HPGDS) et lipocaline (LPGDS). HPGDS est une enzyme cytosolique appartenant à la famille des GST (glutathion S-transferases) (Kanaoka et Urade 2003). On retrouve cette enzyme dans plusieurs types de tissus et cellules : tissus périphérique, CPA, mastocytes, lymphocytes TH₂, les trophoblastes, l'épithélium utérin et dans les glandes endométriales au site d'implantation chez l'humain (Kanaoka et Urade 2003; Michimata et al. 2002). Quant à LPGDS, elle fait partie de la famille des lipocalines et est présente entre autres dans le système nerveux central ainsi que les organes génitaux masculins. Elle est également excrétée dans certains fluides corporels comme par exemple le fluide cérébrospinal et dans la circulation sanguine (Kanaoka et Urade 2003). PGD₂ serait un chemoattractant pour les lymphocytes Th₂ via le récepteur CRTH₂ (Nagata 2003) et aurait des effets lutéotropiques chez les humains (Poyser 1995).

Son rôle dans la gestation est peu connu jusqu'à présent. Une étude réalisée au sein de notre laboratoire a démontré l'implication de cette PG à certaines étapes de la gestation, plus précisément durant l'implantation et la parturition (Kengni et al. 2007).

1.5.6 Les récepteurs des prostaglandines

Les récepteurs des prostaglandines possèdent sept domaines transmembranaires et sont couplés aux protéines G. Les différents récepteurs possèdent une faible homologie et leur région C-terminale qui lie la protéine G varie beaucoup. Les récepteurs des PGs peuvent être divisés en deux groupes. Les récepteurs EP₁, EP₃, FP et le récepteur de la

thromboxane A2 stimulent la contraction du muscle lisse contrairement aux récepteurs DP, EP2, EP4 et IP qui ont un effet de relaxation (Hata et al. 2004).

L'activation des récepteurs des PGs entraîne l'augmentation ou la diminution de seconds messagers tels l'AMPc, le calcium intracellulaire (Ca^{2+}) et les inositol phosphates (Narumiya et al 1999). Le tableau 1 ci-dessous résume les différents seconds messagers impliqués selon le type de récepteur.

Tableau 1.1 : La transduction des signaux par les récepteurs des prostaglandines (Narumiya et al 1999)

Type	Sous-type	Isoforme	Protéine G	Second messenger
DP			G_s	AMPc↑
EP	EP ₁		Non identifié	Ca^{2+} ↑
	EP ₂		G_s	AMPc↑
	EP ₄		G_s	AMPc↑
	EP ₃	EP _{3A}	G_i	AMPc↓
		EP _{3B}	G_s	AMPc↑
		EP _{3C}	G_s	AMPc↑
		EP _{3D}	G_i, G_s, G_q	AMPc↓, AMPc↑, Réponse PI
FP			G_q	Réponse PI
IP			G_s, G_q	AMPc↑, Réponse PI
TP		TPα	G_q, G_i	Réponse PI, AMPc↓
		TPβ	G_q, G_s	Réponse PI, AMPc↑

Légende : PI = Phosphatidyl inositol; AMPc = Adénosine monophosphate cyclique.

Le récepteur DP est le moins abondant des récepteurs. Il a été détecté entre autres au niveau de l'intestin et dans le cerveau. Le récepteur IP a quant à lui été détecté au niveau du cerveau, le muscle lisse des artères et dans des lymphocytes (Narumiya et al 1999).

Quant aux récepteurs de PGE₂, EP₃ et EP₄, ils sont largement répandus dans l'organisme contrairement à EP₁ qui n'a été détecté que dans un certain nombre d'organes. Quant à EP₂, il est le moins abondant des récepteurs EP. Des études ont

démontré que EP2 est induit par les gonadotrophines au niveau des cellules épithéliales luminales de l'utérus. Chez les souris, il a été démontré que la localisation et le nombre de récepteurs EP2, EP3 et EP4 changeaient de façon considérable chez les souris lors de l'induction de la pseudogestation par traitement avec PMSG et hCG (Katsuyama M. et al. 1997). Suite à certaines études, EP2 semblerait être impliqué au moment de l'implantation et EP4 durant la décidualisation (Narumiya et al 1999).

Finalement, en ce qui a trait au récepteur FP, il fut le premier à être isolé puis cloné. L'organe qui exprime le plus l'ARNm de ce récepteur est le *corpus luteum* et son expression varie durant le cycle oestral. Certaines observations tendent à démontrer un lien possible entre l'expression de ce récepteur et la lutéolyse (Motta et al. 1994).

1.6 L'APOPTOSE

1.6.1 La mort cellulaire

L'équilibre entre la mort et la survie cellulaire est essentiel au bon fonctionnement de l'organisme. La mort d'une cellule peut être causée par différents facteurs au sein de l'organisme. Par exemple, la cellule peut avoir été endommagée par un processus physique ou encore, elle peut avoir subi des mutations qui nuisent à son bon fonctionnement. Il existe différents types de mort cellulaire : l'apoptose, la nécrose, la sénescence, l'autophagie et finalement, la catastrophe mitotique. Dans le cadre de ce mémoire, seulement la mort cellulaire par apoptose sera décrite.

1.6.2 L'apoptose

L'apoptose est définie comme étant une mort cellulaire programmée et est comparée à un suicide cellulaire. La présence d'apoptose dans l'organisme est primordiale pour le maintien de l'équilibre entre la mort et la prolifération cellulaire. L'apoptose est essentielle entre autres pour le développement embryonnaire, les menstruations chez les femmes, certaines fonctions du système immunitaire et

l'homéostasie en général (Okada et al. 2004). Durant l'implantation chez les rats, l'apoptose a été observée au niveau des cellules épithéliales et durant la régression déciduale au niveau de l'endomètre utérin (Welsh et al. 1985; Welsh 1993).

L'apoptose sert à éliminer les cellules endommagées et qui peuvent devenir nuisible à l'organisme. Une cellule apoptotique est caractérisée par la présence de chromatine condensée, d'ADN fragmenté et « blebbing » de la membrane cellulaire (Brown J.M. and Attardi L.D. 2005). L'apoptose est contrôlée par un équilibre entre les facteurs de survie cellulaire et de mort cellulaire. Un dérèglement de cet équilibre peut mener à certains problèmes pathologiques tels le cancer ou un dysfonctionnement du système immunitaire (Okada et al. 2004). Le déclenchement de l'apoptose se traduit par l'activation de protéines par clivage: les caspases. Les caspases sont présentes dans la cellule sous forme de zymogène (précurseur sous forme inactive) et doivent être clivées afin d'être activées. La protéine Caspase-3 est une des exécutrices clés de l'apoptose. L'apoptose peut être initiée par des signaux extra ou intracellulaires. Suite à son exécution (action des caspases), les corps apoptotiques qui en résultent sont phagocytés par des cellules environnantes lesquelles dégradent les corps apoptotiques.

La voie menant à l'activation de caspases peut être soit intrinsèque ou extrinsèque. La voie extrinsèque est activée par l'engagement de récepteurs de mort cellulaire (death receptors) à la surface de la cellule. Le plus étudié de ces récepteurs est FAS () et son ligand. La liaison du ligand à son récepteur induit la formation du complexe DISC (« death-induced signalling complex ») qui recrute la caspase-8 et promouvoit l'activation de la cascade de procaspases (Okada et al. 2004).

Quant à la voie intrinsèque, elle est engendrée suite à plusieurs stress intracellulaires et extracellulaires (hypoxie, bris dans l'ADN, etc.). Les signaux induits suite à ces stress entraînent une perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. Le cytochrome C est alors relâché ainsi que des molécules pro-apoptotique, puis il y a formation d'un apoptosome et finalement, il y a activation des

caspases. Une fois le cytochrome C relâché, la cascade d'activation des caspases est irréversible (Okada et al. 2004).

Plusieurs protéines sont impliquées dans la régulation de la mort cellulaire dont les facteurs de mort ou survie cellulaire BAX et BCL-2. BAX est une protéine pro-apoptotique contrairement à BCL-2 qui a des propriétés anti-apoptotiques. BCL-2 empêche la relâche du cytochrome C de la mitochondrie contrairement à BAX, ce qui empêche l'activation des caspases. L'implication de ces deux facteurs a été démontrée lors de la gestation. Dans la décidue mature par exemple, la mort cellulaire est précédée par un changement dans le ratio BAX/BCL2. En effet, la régression des cellules déciduales situées au pôle mésométrial, du début jusqu'au milieu de la gestation, serait reliée au niveau d'expression des protéines BAX et BCL-2 chez la rate (Dai et al. 2000). Il a également été démontré que BAX et BCL-2 sont impliqués dans la régulation de l'apoptose des cellules déciduales chez des rates pseudogestantes (Akcali et al. 1996). De plus, BCL-2 est exprimée dans les cellules glandulaires durant la phase proliférative de l'endomètre et disparaît durant la phase sécrétoire.

Un autre exemple est SMAC/DIABLO qui est relâché de la mitochondrie dans le cytosol durant le processus d'apoptose. Ce facteur favorise l'activation des caspases en neutralisant les membres de la famille des protéines inhibitrices d'apoptose (IAP s) dont la protéine XIAP (« X-linked inhibitor of apoptosis protein »). Une étude réalisée par notre laboratoire (Leblanc et al. 2003) a démontré la présence de XIAP et Smac/Diablo dans l'endomètre de la rate et leur régulation par l'œstrogène. XIAP a également été détecté dans les cellules de la *granulosa* chez le rat et dans les cellules épithéliales de l'ovaire chez l'humain (Shooner et al. 2005).

1.7 HYPOTHÈSES

En considérant une possible implication de COX-2 dans l'invasion et la prolifération cellulaire, l'hypothèse émise dans le cadre de cette étude est que COX-2

joue un rôle clé dans l'implantation et la régression déciduale durant la gestation chez la rate.

Des études précédentes ont évoqué une régulation différente de COX-1 et COX-2 durant l'implantation chez les rates. COX-1 serait influencé par les hormones stéroïdiennes et COX-2 principalement par le blastocyste. L'hypothèse est que COX-2 est aussi régulé (en partie) par les hormones stéroïdiennes tout comme COX-1.

L'hypothèse générale de la présente étude est que les cyclooxygénases et les prostaglandines produites sont des régulateurs importants dans l'implantation, la décidualisation, la régression déciduale et la parturition.

1.8 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

Un premier objectif de cette étude étaient d'analyser l'expression et la régulation des enzymes COX-1 et COX-2 durant la gestation, la pseudogestation et durant le cycle oestral.

Un second objectif était d'analyser si l'augmentation des métabolites de PGE2 et PGF2 α à des stades précis du cycle oestral et de la gestation corrélait avec l'expression d'une ou des deux COXs.

De plus, un autre objectif a été de caractériser l'expression de la prostaglandine D synthase (PGDS) ainsi que la prostacycline synthase (PGIS) dans l'endomètre de la rate.

CHAPITRE 2

ARTICLE 1

2.1 PRÉFACE

Les auteurs du chapitre 2 sont : moi-même, 1^{er} auteur, j'ai effectué la majeure partie des expérimentations, le traitement de données et la rédaction de l'article, Junie Hurette Chansi Kengni, 2^e auteur, elle a participé en collaboration avec Sophie Parent, 3^e auteur, à l'obtention des résultats pour les figures 8 et 9 du présent chapitre et finalement, Éric Asselin, dernier auteur, qui a élaboré la stratégie expérimentale, effectué la supervision des travaux et aussi la révision de l'article.

2.2 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

2.2.1 Objectifs de l'étude

Les prostaglandines sont des médiateurs lipidiques dérivant de l'acide arachidonique qui sont impliqués dans la régulation de plusieurs processus physiologiques dont les fonctions reproductives. Les PGs semblent impliquées au niveau de l'ovulation, l'implantation, la décidualisation ainsi que la parturition. La synthèse des PGs débute par la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines endoperoxyde (PGH₂) via une enzyme nommée cyclooxygénase (COX). L'objectif de la présente étude était d'analyser l'expression et la régulation des enzymes COX-1 et COX-2 durant la gestation, la pseudogestation et durant le cycle oestral. Nous avons également analysé si l'augmentation des métabolites de PGE₂ et PGF₂ α à des stades précis du cycle oestral et de la gestation corrélait avec l'expression d'une ou des deux COXs.

2.2.2 Méthodes

Pour cette étude, des rates de type Sprague-Dawley (200–225 g) ont été utilisées. Les rates ont été sacrifiées et leur utérus prélevé à différents jours de la gestation (jours 2

à 22), de la pseudogestation (jours 1 à 9) et aux différents stades du cycle oestral (diestrus, proestrus, oestrus et métestrus). Les protéines et l'ARN ont été extraits et utilisés respectivement pour des analyses Western Blot et RT-PCR en temps réel. Des sections de tissus ont également été utilisées afin de localiser les protéines en effectuant des analyses immunohistochimiques. La quantification des métabolites de PGF2 α et PGE2 dans le sérum a été réalisée par ELISA.

2.2.3 Résultats

COX-1 et COX-2 ont été détectés dans l'endomètre de la rate durant le cycle oestral et aussi lors de la gestation ainsi que la pseudogestation. L'expression de COX-2 semblait être modulée durant le cycle oestral et était maximale à l'estrus (ovulation). Quant à COX-1, son expression était élevée durant la période de l'implantation et de décidualisation et était maximale en fin de gestation (parturition). De plus COX-1 était très faiblement exprimé durant la période de la régression déciduale contrairement à COX-2 qui était élevé durant cette même période. COX-2 a été également détecté aux jours 2 à 5 en début de gestation et durant la parturition. Les deux enzymes semblaient être modulées durant la pseudogestation chez la rate, ce qui suggère une régulation par l'œstrogène et la progestérone. Quant à PGF2 α et PGE2, il a été démontré que le métabolite de PGF2 α était fortement présent durant le proestrus et le métestrus. Quant au métabolite de PGE2, il était élevé durant le proestrus. Les résultats obtenus durant la gestation ont révélé une augmentation du métabolite de PGE2 aux jours 10, 12 et 14 et une augmentation de PGF2 α au jour 14, ce qui coïncide avec la période de régression déciduale. Pour finir, une augmentation des deux métabolites a été observée vers le jour 7 de la pseudogestation.

2.2.4 CONCLUSIONS

Les résultats obtenus au cours de cette étude suggèrent une régulation différente de COX-1 et COX-2 par l'œstrogène et la progestérone. Ces enzymes semblent être des facteurs clés impliqués au cours de l'implantation embryonnaire, la décidualisation, la

régression du tissu décidual et la parturition. De plus, COX-2 semble être impliqué dans le contrôle de l'apoptose durant l'implantation, la régression déciduale et durant le cycle oestral de la rate.

2.3 ARTICLE

EXPRESSION OF COX-1 AND COX-2 IN THE ENDOMETRIUM OF CYCLIC, PREGNANT AND PSEUDOPREGNANT RATS AND THEIR REGULATION BY SEX STEROIDS

Isabelle St-Louis, Junie Hurette Chansi Kengni, Sophie Parent and Éric Asselin*

Département de Chimie-Biologie, Groupe de Recherche en Biopathologies Cellulaires et Moléculaires, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

Short title: COX-1 and COX-2 expression in the rat endometrium.

Key Words: cyclooxygenases, prostaglandin E2 and F2 α , pregnancy, implantation, decidualization, parturition, apoptosis.

*Corresponding Author: Eric Asselin, Ph.D.
Département de Chimie-Biologie
Section Biologie Médicale
Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500
Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7
E-mail: Eric.Asselin@uqtr.ca

This work has been supported by a grant from NSERC (238501-01). Eric Asselin is a recipient of a fellowship from the Fond de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ), New Investigator of the Canadian Institute of Health Research of Canada (CIHR) and is holder of the Canada research chair in Molecular Gyneco-oncology.

ABSTRACT:

AIM: Prostaglandins (PGs) are lipid mediators and critical regulators of a number of reproductive processes, including ovulation, implantation, decidualization and parturition. PGs derive from the conversion of arachidonic acid into endoperoxide prostaglandins (PGH₂); cyclooxygenases (COXs) are rate limiting enzymes in this process. The aim of the present study was to investigate the expression and regulation of COX-1 and COX-2 during rat pregnancy, pseudopregnancy and estrous cycle. We also investigated if the increase of PGE₂ and PGF₂ α in the uterus at specific stages of pregnancy and estrous cycle correlated with the expression of one or both cyclooxygenases.

METHODS:

Uteri were collected from cyclic, pregnant and pseudopregnant rats at each day of the estrous cycle (metestrus, proestrus, estrus and diestrus) and each two days of pregnancy (days 2 to 22) and pseudopregnancy (days 1 to 9). Endometrial protein extracts were used for Western blot analysis and tissue sections were prepared for protein localization using immunohistochemistry. Measurements of PGF₂ α and PGE₂ metabolites in serum were performed by enzyme immunoassay (EIA).

RESULTS:

COX-1 and COX-2 were detected in the endometrium of cyclic, pregnant and pseudopregnant rats. COX-2 protein expression was modulated during estrous cycle and increased at estrus phase. During pregnancy, COX-1 expression was high during implantation and decidualization periods and decreased to a low level until parturition. COX-2 was detected during early pregnancy from day 2 to 5, increased during decidual regression, and was also detected during parturition period. Both enzymes were modulated during pseudopregnancy, suggesting that they are regulated by 17 β -estradiol and progesterone. We also found a significant increase in PGF₂ α metabolite at proestrus and metestrus and an augmentation of PGE₂ metabolite at proestrus phase during

estrous cycle. The results also showed a significant increase of PGE2 metabolite on days 10, 12 and 14 of pregnancy and an augmentation of PGF2 α at day 14 which corresponds to the decidual regression period. Finally, the concentration of both metabolites changed during pseudopregnancy and was increased at day 7.

CONCLUSIONS:

Taken together these results suggest that COX-1 and COX-2 are regulated differently by steroid hormones and might be key factors involved in embryo implantation, decidualization, *decidua basalis* regression and parturition. Also, COX-2 might be directly or indirectly involved in the control of epithelial cells apoptosis during implantation, *decidua basalis* regression and during the estrous cycle.

Introduction

Prostaglandins (PGs) are lipid mediators that play many important roles in female reproductive functions and are essential for maintain of pregnancy. PGs derive from the conversion by COX enzymes (Williams *et al.* 1999) of arachidonic acid into prostaglandin G₂, which is further metabolized into endoperoxyde prostaglandins PGH₂. COX is an integral membrane protein with cyclooxygenase and peroxidase activities and comprises three independent folding units: an epidermal growth factor domain, a membrane binding motif and an enzymatic domain (Picot *et al.* 1994). This enzyme exists in two isoforms, COX-1 that is known to be a constitutive enzyme expressed in most tissues (Garavito and DeWitt 1999) and COX-2 that is considered like an inducible enzyme. COX-2 expression can be induced by a multitude of stimuli that include growth factors, cytokines, hormones and inflammatory stimuli. COX-1 and COX-2 proteins present a homology that average 60% and are encoded by two genes located on different chromosomes (Hla *et al.* 1999). These two isoforms present an important structural difference in their active site, namely a substitution of isoleucine 523 in COX-1 for a valine in COX-2 (Simmons *et al.* 2004). According to some studies, COX-1 would be play a role during parturition (Reese *et al.* 2000), and COX-2 during ovulation, fertilization, implantation and décidualisation (Lim *et al.* 1997).

Biosynthesis of prostaglandins implicates different prostaglandin synthases that convert COX-metabolite PGH₂ in different prostaglandins including PGE₂, PGF₂ , PGD₂, PGI₂ and thromboxane A₂ (TXA₂). PGE₂ is synthesized by PGES and can act through four receptors: EP₁, EP₂, EP₃ and EP₄. EP₃ and EP₄ receptors have a higher affinity for PGE₂ than EP₁ and EP₂ (Hata and Breyer 2004). Also, PGE₂ can have different effects that depend in part on the receptor implicated. PGE₂ and PGI₂ are suspected to be implicated in the augmentation of vascular permeability during implantation and would be essential for decidualization (Kennedy 1980). PGF₂  is synthesized by PGFS and acts through FP receptor. This prostaglandin is known to play a crucial role in myometrium during parturition by augmenting the oxytocin-induced contractions (Fuchs 1987). Recent studies in our laboratory suggested that PGD₂ and

PGI₂ may also play a role in many important steps of rat pregnancy (Kengni *et al.* 2007).

Successful implantation in rodents depends on the communication between the blastocyst and the uterus. The first step of embryo implantation in rodents is characterized by the blastocyst attachment to the luminal epithelium. Many exchanges occur at this time between the embryo and the uterine luminal epithelium that are mediated by growth factors, hormones, adhesion molecules, extracellular matrix and prostaglandins (Sharkey and Smith 2003). During implantation in rodents, apoptosis is observed in endometrial epithelial cells and this phenomena also occurs during late pregnancy, especially during regression of the *decidua basalis* (DB) in the rat endometrium (Welsh and Enders 1993; Welsh 1993). Two decidual zones are formed during pregnancy: the primary decidual zone on the antimesometrial side of the uterus and the secondary decidual zone or antimesometrial decidua (Welsh and Enders 1985). The secondary decidual zone regresses following day 14 of pregnancy (Moulton 1994). According to a study from Uotila *et al.*, the expression of COX-2 but not of COX-1 is stimulated in glandular epithelium of proliferative endometrium and in cancer cells of human endometrial adenocarcinoma (Uotila *et al.* 2002). That suggests a possible role of COX-2 in the regulation of endometrial cells proliferation. A role of COX-2 in cell invasiveness has been also observed in some cancer cells (Larkins *et al.* 2006). By considering a possible implication of COX-2 in cells invasiveness and proliferation, we hypothesised that COX-2 play a key role in implantation and *decidua basalis* regression during rat pregnancy. Previous studies have evoked different regulation of COX-1 and COX-2 during implantation in rodents. COX-1 would be influenced by ovarian steroid and COX-2 would be regulated mostly by the implanting blastocyst (Chakraborty *et al.* 1996). We hypothesised that COX-2 is also regulated in part by the ovarian steroids as COX-1.

The regulation and role of each COX enzyme and prostaglandin metabolite during pregnancy and the estrous cycle in rodents is not completely understood. The exact role of each prostaglandins and the role played by COX-1 and COX-2 are not totally

elucidated. The aim of the present study was to investigate the expression of COX-1 and COX-2 during rat pregnancy, pseudopregnancy and estrous cycle. We also investigated if the augmentation of PGE2 and PGF2 α at specific stages of pregnancy and estrous cycle correlated with the augmentation of one or both cyclooxygenases.

Methods

Reagents

COX-1 (murine) polyclonal antibody (Cat. No.160109, lot # 126592-126593, 200 μ g), and COX-2 (murine) polyclonal antibody-affinity purified (Cat.No. 160126, lot #115702, 200 μ g) were purchased from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI). Prostaglandin F2 metabolite 13,14-dihydro-15-keto PGF2 α and prostaglandin E2 metabolite 11 beta-PGF2 were purchased from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI). Vectastain ABC Kit for rabbit IgG and Vector Nova Red were purchased from Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA). 17 β -estradiol (E2) and progesterone were purchased from Laboratoire Mat (Quebec, Qc, Canada).

Animals

Sprague-Dawley female rats, 200–225 g, were obtained from Charles River Laboratories Canada. Animals were maintained on standard chow and water, which were available *ad libitum*, in animal facilities illuminated between 6:00 h and 20:00 h. All procedures were performed in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care for the handling and training of laboratory animals and the Good Health and Animal Care Committee of the Université du Québec à Trois-Rivières. Stages of the estrous cycle were confirmed by vaginal smears. Rats with three regular cycles of 4 days were used in these experiments and killed at various stages of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus). Also, male and female mice were mated overnight and pregnancy was confirmed by vaginal smears and/or the presence of a vaginal plug (day 1). Rats were killed on day 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 of pregnancy at 10:00 h in the morning and at 18:00 h for days 5.5 and 6.5. Six to 8 different rats were used for

each time of pregnancy. Uteri were collected and fixed for immunohistochemical staining (IHC). Endometrial protein extracts were collected for Western blot analysis and RNA was isolated using TRIZOL™ reagent for real-time PCR analysis.

Pseudopregnancy

A total of 3 rats per day of pseudopregnancy were ovariectomized and then allowed to recover from surgery for a minimum of 10 days. They were pre-treated with physiological doses of estradiol (1,3,5(10)-Estratriene-3,17 β -diol, Sigma-aldrich) and progesterone (Laboratoire Mat, PQ) to induce decidualization as described previously (Kennedy and Ross 1993): 1) 0.2 μ g estradiol injection per day for three days (in the morning, day -2,-1 and 0); 2) On the third day (day 0 of pseudopregnancy), another injection in the afternoon of estradiol (0.2 μ g) and progesterone (1 mg) was performed; 3) No treatment for 2 days (day 1 and 2 of pseudopregnancy); 4) Injections of estradiol (0.1 μ g) and progesterone (4 mg) for three days (day 3, 4 and 5 of pseudopregnancy); 5) Another injection of estradiol (0.1 μ g) in the afternoon on day 7 (day 4 of pseudopregnancy); 6) Rats were killed on day 1,3,5,7 and 9 of pseudopregnancy. Uteri were collected and fixed for immunohistochemical staining (IHC). Endometrial protein extracts were collected for Western blot analysis and RNA was isolated using TRIZOL™ reagent for real-time PCR analysis.

Immunohistochemical staining

The uterus was fixed in 4% paraformaldehyde solution and embedded in paraffin. Tissue sections 7 μ m thick were mounted on polylysine-coated slides, deparaffinized, rehydrated, and then heated in 10 mM citrate buffer (pH 6) containing triton X-100 (Sigma-Aldrich) 0.1% (v/v). After two washes with PBS, slides were then incubated with 0.3 % hydrogen peroxide in methanol for 30 min to quench endogenous peroxidase activity. After washing with PBS, tissues were incubated with blocking serum (Vectastain ABC Kit) at room temperature for 1 h. Then, a primary antibody diluted in blocking serum (COX-1 and COX-2 1/50 dilution) was added to the slides and incubated at 4°C overnight in a humidified chamber. After washing 5 min. in PBS, tissue sections

were incubated for 30 min. with 3 µg/ml biotinylated antibody (anti-rabbit). Subsequently, slides were washed with PBS and incubated with avidin-biotin complex reagent containing horseradish peroxidase for 30 min. Slides were washed with PBS for 5 min and color development was achieved using Vector NovaRedTM (substrate kit for peroxidase). The tissue sections were counterstained with haematoxylin. Negative controls were performed using the same protocol but substituting the primary antibody with normal rabbit IgG (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA).

Protein extraction and Western analysis

Protein homogenates from pregnant endometrium were isolated according to a protocol previously described (Dai and Ogle 1999). Briefly, uteri from day 2 to day 20 pregnant rats were rapidly excised and placed in ice-cold saline until dissected. Uteri were carefully laid on a glass plate and placed on the stage of a dissecting microscope. In early pregnancy (day 2 to 5.5), total endometrium was scraped using a microscope glass and collected. Uteri from day 6 to 10 the placenta and decidua were at an early stage of differentiation and could not be reliably separated. For this reason, DB dissected from animals between these days of pregnancy contains some chorioallantoic cells, but antimesometrial decidua, choriovitelline tissues, fetus, and myometrium were removed. Even though we carefully dissected DB from these tissues, it is a possibility that a contamination with some antimesometrial decidual cells that regress to form the deciduas capsularis (DC) would occur. In uteri collected from day 12 to 20 pregnant rats, DB was isolated by gently separating the placenta and myometrial regions with 23-gauge needles. Additionally, the DB began to regress on day 14 and became too thin to reliably dissect after Day 17. The protocol for DB isolation was described previously by Ogle and George (Ogle and George 1995).

Endometrial cells from pregnant animals were homogenized using a pipette in RIPA lysis buffer (PBS 1× pH 7.4; 1% Nonidet P-40; 0.5% Sodium deoxycholate; 0.1% SDS; Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Diagnostics Canada, PQ)). Homogenates were centrifuged ($12,000 \times g$ for 20 min at 4°C) to remove insoluble

material. The supernatant was recovered and stored at -20°C pending analysis. Protein content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay. Protein extracts (50 µg) were heated at 94°C for 3 min, resolved by 10% SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membranes using a semidry transfer apparatus (Bio-Rad, Mississauga, ON). The membranes were then blocked 2 h at room temperature with PBS containing 5% milk powder, then incubated with anti COX-1 1:1000 and COX-2 1:2000 and subsequently with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:3000; room temperature for 45 min). All membranes were stripped with Restore™ western blot stripping buffer (Pierce, # 21059, lot # FH71541), and reprobed with an antibody specific to β -actin which was used as an internal standard. Peroxidase activity was visualized with the Super signal® West Femto maximum sensitivity substrate (Pierce, Arlington Heights, IL, USA), according to the manufacturer's instructions. Signal was visualized using the Biochemi Imaging System (UVP, CA, USA). Densitometrical analyses were performed (protein of interest and β -actin) using the GelDoc 2000 and the Quantity One software (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Results are expressed as a ratio (protein of interest/ β -actin) to correct for loading for each endometrial sample.

Real-Time PCR analysis

Endometrial cells from pregnant, pseudopregnant and non pregnant endometrium were isolated according to a protocol previously described. In order to measure COX-1 mRNA, primers were chosen as described below and tested with different primer concentrations and different cycles to avoid mRNA amplification near plateau and saturation. Total RNA (0.2 µg/µl) were used for preparation of first strand cDNA by reverse transcriptase (RT). The RNA samples were incubated (65°C, 10 min) with 2 µl oligo dT (deoxythymidine) primers in a final volume of 10 µl. Samples were then incubated (37°C, 60 min) in 20µl of a reaction buffer (1X) containing dithiothreitol (DTT;100mM), deoxynucleotides triphosphates (dNTPs; 5mM) and Muloney murine leukemia virus transcriptase (MMLV-RT; 200U). The reaction volumes were brought up to 60 µl with autoclaved water. Reactions without MMLV-RT were also conducted to

ensure that no genomic DNA contaminated the cDNAs obtained. Rat COX-1 cDNA was amplified using sense primer 5'-3' GCC TCG ACC ACT ACC AAT GT and antisense primer 5'-3' AGG TGG CAT TCA CAA ACT CC. Each reaction mixture (final volume, 20 μ l) contains RT template or negative control (2 μ l), MgCl₂ (3mM), primers (1 μ M), and LC DNA FastSTART DNA Master SYBR Green 1 (10 μ l) (Roche). Each PCR reaction was inserted in a LightCycler capillary. The PCR cycling conditions chosen were (1) 15s at 94°C; (2) 20s at 60°C; and (3) 10s at 72°C. A melting curve was generated for each reaction and the conditions were (1) 95°C, (2) 30s at the annealing temperature, and (3) temperature up to 95°C (0.2°C/s). Finally the DNA concentration of each reaction was determined quantitatively using a standard curve. GAPDH was used as the control reaction.

Prostaglandin metabolites enzyme immunoassay

After collection from the animals, blood was allowed to clot for 30-60 min at 37°C. The serum was then separated from the clot and any remaining insoluble material removed by centrifugation at 3500 rpm for 10 min at 4°C. After preparation, serums were kept at -80°C until further use. EIAs for prostaglandins metabolites were performed according to manufacturer's instructions. Briefly, 50- μ l of serum obtained during experimentation was used for each of the PGF₂ α and PGE₂ metabolites in 96-well plates coated with goat anti-rabbit igG antibodies. 50 μ l of metabolite tracer and 50 μ l of the metabolite specific antibody were added to each well. The plates were incubated overnight at 4°C or room temperature depending on the metabolite. Then, wells were washed five times with 10mM phosphate buffer (pH 7.4) containing Tween-20 (0.05%) at pH 7.4; and 200 μ l of Ellman's reagent (69 mM acetylthiocholine and 54 mM 5,5'-dithio-bis [2-nitrobenzoic acid] in 10mM phosphate buffer, pH 7.4) was added to each well and plates were incubated in the dark at room temperature for 60-90 min. This allows the bound enzyme tracer to react with Ellman's reagent to yield a yellow solution that can be measured photometrically with a microplate reader at 420 nm. A standard curve was developed simultaneously with standards of the PGs metabolites, and determination of metabolite concentrations relative to those standards was calculated.

Statistical analysis

Western analyses of pregnant animals were repeated 3 or 4 times (3 to 4 different endometrial extract per day of pregnancy from 3 to 4 different rats). Endometrial extracts from each rat were assessed individually. Results subjected to statistical analyses were expressed as mean \pm SEM. Data were subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 4.0; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test.

Results

Expression of COX-1 mRNA in the rat endometrium

To determine basal levels of COX-1 transcript in the uterus during pregnancy, pseudopregnancy and estrous cycle, quantitative real-time PCR was performed. The results showed that high levels of COX-1 transcript were maintained in the endometrium throughout estrous cycle, although a down regulation of COX-1 was observed during estrus phase (Fig. 2.1A). The results showed also that COX-1 was expressed throughout pregnancy (Fig.2.2 A, B), and highest levels were measured at days 4 (pre-implantation period) and 20-21 (parturition). Noteworthy, COX-1 transcript was almost undetectable at days 10 to 16 (decidual regression). Analyse of cDNAs from pseudopregnant uteri revealed an increase of COX-1 expression on days 3 and 5 (decidualization) (Fig. 2.3A), suggesting that COX-1 is regulated by sex steroids in the pregnant uterus.

Expression of COX-1 protein in the pregnant rat endometrium

In order to confirm results obtained at the mRNA level, Western analyses were performed on uterine sections and lysates of pregnant uteri respectively to analyze COX-1 protein levels during rat pregnancy (Fig. 2.2 C, D). Similar to its mRNA profile, we found that COX-1 protein was significantly increased at days 4 to 5.5 of early pregnancy (implantation) and its expression was maximal at days 21 and 22 (parturition); moreover, the enzyme was almost undetectable from days 8 to 16 of pregnancy (Fig.

2.2C, D). Collectively these results suggest a role for COX-1 in implantation and parturition, but not in decidual regression.

Expression of COX-2 in the pregnant rat endometrium

To document the pattern expression of COX-2 protein in the rat uterus during pregnancy, Western analyses were performed on lysates of pregnant rat endometrium (Fig. 2.5). Our results showed that COX-2 protein was not present at all days of pregnancy but was rather induced during specific steps of pregnancy. COX-2 protein was present in pregnant rats endometrial cells from days 2 to 5 (pre-implantation period) and was induced from days 8 to 12; maximal level was reached at day 12 (decidual regression). The enzyme was undetectable from days 18 to 21 but was induced at days 21 and 22 (parturition). COX-2 expression profile during pregnancy thus suggests a role for the enzyme in implantation, decidual regression and parturition.

Expression of COX-1 and COX-2 during pseudopregnancy

To determine whether COX proteins were modulated by 17β -estradiol and progesterone in the endometrium during pregnancy, Western analysis were performed on lysates from pseudopregnant rat endometrium (Fig. 2.3B and 2.6). COX-1 was significantly increased at day 5 of pseudopregnancy (decidualization), while COX-2 was absent at day 5 but induced at day 9 (period preceding decidual regression). These results indicate that sex steroids can modulate the expression of COX enzymes in the endometrium, although the two enzymes would be differently regulated.

COX-1 and COX-2 expression in female rat endometrium during the estrous cycle

Western analysis performed on endometrial lysates at different phases of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus) revealed a higher level of COX-2 at the estrus phase compared to the three other phases (Fig. 2.4B), but no significant variation of COX-1 protein throughout the cycle (Fig. 2.1B).

Localization of COX-1 and COX-2 proteins in rat endometrium

To localize COX-1 and COX-2 proteins, uterine tissues from pregnant rats were sectioned and immunohistochemical analyses were performed (Fig.2.7 for COX-1 and 2.8 for COX-2). The results showed that both enzymes were expressed principally in luminal and glandular endometrial epithelial cells but also in the stroma. The results also confirmed the presence of COX-1 on day 5.5 (implantation) and 20 (parturition) and COX-2 on day 5 (implantation) and 8 (period preceding decidual regression). Furthermore, COX-1 was detected on uterus tissues collected during proestrus phase and COX-2 during estrus.

Serum concentration of prostaglandins during pregnancy

To determine if the augmentation of cyclooxygenases at specific times of pregnancy was followed by an increase in production of PGE2 and PGF2 α , PGF2 α metabolite (13,14-dihydro-15-keto-PGF2 α) and PGE2 metabolite (13,14-dihydro-15-keto PGE2) were measured at the same time by EIA. According to our results, PGE2 and PGF2 α metabolites seem to be increased at day 5.5 of pregnancy (Fig. 2.9A and 2.10A). Our results also show the augmentation of prostaglandin E and F2 α metabolites during decidual regression at days 10, 12 and 14 for PGE2 metabolite (Fig. 2.9A), and at day 14 for PGF2 α metabolite (Fig. 2.10A). During pseudopregnancy, PGE2 and PGF2 α metabolites similarly reached maximal concentration day 7 (Fig. 2.9B and 2.10B). During the estrous cycle, our results showed significantly higher levels of PGE2 and PGF2 α metabolites at proestrus (Fig. 2.9C and 2.10C).

Discussion

This type of study is very important to improve the comprehension of embryo implantation and the involvement of prostaglandins in the maintain of pregnancy. Clinical and basic research will permit some day to resolve problems of female infertility, improve fertility in women, and possibly lead to the development of new and improved contraceptive methods. Moreover, the comprehension of all processes occurring during pregnancy will help to find appropriate medication to prevent preterm birth and others problems that can occur during pregnancy. Successful implantation is the result of reciprocal interactions between the implantation-competent blastocyst and receptive uterus, and requires invasion of embryo into the stromal vasculature (Enders and Schlafke 1969). Later, maintain of pregnancy also involves regression of *decidua basalis*, where decidual cells undergo apoptosis. Cyclooxygenases have been implicated in female reproduction (Matsumoto *et al.* 2001; Wang and Dey 2005), and because they can modulate cellular invasive properties (Larkins *et al.* 2006) as well as control the balance between apoptosis and survival in various cell types (St Germain *et al.* 2004), we hypothesized that COXs and their prostaglandin metabolites are crucial regulators of implantation and decidual regression. Due to impracticalities of studying implantation in humans, implantation has been studied in different animal species. In the last few years our laboratory has developed an expertise in female rat reproductive functions (Dery *et al.* 2003; Leblanc *et al.* 2003; Shooner *et al.* 2005). In the present study, we have used this rat model to characterize the presence, activity and regulation by sex steroids of COX-1 and COX-2 at specific stages in the pregnant, pseudopregnant and non-pregnant rat uterus.

COX-1 is known to be a constitutive enzyme that plays “housekeeping” functions in many tissues. Our results, nonetheless, demonstrate that COX-1 mRNA and protein level can be down-regulated in the rat endometrium; indeed, COX-1 expression was almost undetectable from days 10 to 16 of pregnancy during decidual regression period. Moreover, COX-1 expression seems to be regulated by sex steroid hormones, since COX-1 levels were elevated at specific days of pseudopregnancy. Analysis of

expression profile revealed that COX-1 may play a specific role during implantation, decidualization and parturition in the rat endometrium. In agreement, Reese and collaborators had shown that COX-1 is a major source of PGs during parturition and is essential for successful parturition (Reese *et al.* 2000).

In this study, we did not observe a significant augmentation of COX-2 during implantation, but COX-2 has been detected at the beginning of pregnancy from day 2 to 5 and was detected by IHC in epithelial and stromal cells. Others studies in mice have shown that COX-2 was present in epithelial cells near the site of blastocyst attachment in mice which enter apoptosis during blastocyst invasion (Wang and Dey 2005). COX-2 may be expressed in response to the augmentation of apoptosis to limit the cells death to the concerned region. Interestingly, experiments with COX-2 *-/-* mice revealed that the lost of COX-2 expression can be compensated by COX-1 to rescue female infertility in a genetic background-dependant manner (Wang *et al.* 2004, Wand and Dey 2005). Since, COX-1 and COX-2 are both present at the beginning of pregnancy, it is possible that both enzymes participate to augment the production of PGs such as PGE2 and PGF2 α . By analyzing the quantity of PGE2 and PGF2 α metabolites during pseudopregnancy, we observed an augmentation of both metabolites at day 7 and also at day 9 for PGE2 metabolite. Interestingly, COX-2 protein expression increased from day 3 to 9. These results suggest that the augmentation of COX-2 is responsible in majority for the augmentation of PGE2 and PGF2 α during this period. These results coincide with expression of COX-2 protein during pregnancy from day 8 to 16 where COX-2 is highly express and COX-1 is almost absent. At the same time, we measured an augmentation of PGE2 and PGF2 α metabolite. Taking together, these results suggest that COX-2 plays a role during the regression of decidua by producing PGE2 and PGF2 α . Moreover, the variation of COX-2 expression during pseudopregnancy indicates that the enzyme is not only influenced by the implanting blastocyst during early pregnancy but also by steroid hormones produce by maternal tissue.

According to real time PCR results, COX-1 seems to be downregulated at estrus stage although protein levels did not vary significantly. On the other hand, COX-2 is

highly induced at the estrus phase. It has been shown that, during estrous cycle, apoptotic death was poorly present at proestrus but was increasing at estrus phase in rats (Dery *et al.* 2003). This suggests a role for COX-2 in the regulation of apoptosis in the endometrium; COX-2 was also increased during decidual regression, where apoptosis takes place. Ovarian steroids concentration increases from diestrus to proestrus (Smith *et al.* 1975), concomitant with COX-2 up-regulation; furthermore, in the pseudopregnant rat model, COX-2 is increased by estrogen and progesterone. Together, these results strongly suggest that similar to COX-1, COX-2 expression is regulated by sex steroid in the endometrium.

PGF2 α is a prostaglandin that has been studied for its different roles in the uterus. Many studies showed that PGF2 α is the PG which induces luteal regression (Diaz and Wiltbank 2005; Olofsson and Selstam 1988; Tanaka *et al.* 2004). Luteolytic capacity is defined as the ability of corpora lutea (CL) to undergo luteolysis and secretion of PGs which appears to be elevated in the early *corpus luteum* (CL) and during the period of luteolysis. During the estrous cycle at proestrus and metestrus, our study showed a significant increase in PGF2 α metabolite. This increase suggests that PGF2 α might be involved in the process of luteolysis in rats. In this study, we showed a significant increase of PGE2 metabolite on days 10, 12 and 14 of pregnancy. We also demonstrated a significant increase in PGE2 metabolite at proestrus. Recent studies showed that PGE2 induces proliferation of human endometrial epithelial cells (Jabbour and Boddy 2003). The significant increase of PGE2 metabolite at proestrus may suggest its implication in cellular proliferation as seen in the endometrium during this period preceding embryo implantation. Kennedy and Ross (Kennedy and Ross 1993) studies have clearly showed that PGE2 is involved in decidualization and its implication in the uterine cell proliferation had already been shown in humans (Jabbour and Boddy 2003). Here we show that PGE2 might also be involved in *decidua basalis* regression since it is significantly increased during this specific period of pregnancy. Recently, we have showed in our laboratory that TGF- β isoforms are increased in the *decidua basalis* and induced apoptosis in decidual cells *in vitro* suggesting that TGF- β might be involved in *decidua basalis* regression (Shooner *et al.* 2005). Whether TGF- β induces decidual cells

apoptosis through the induction of COX-2 and consequently an increase of PGs remains to be elucidated during rat pregnancy. Some studies have suggested a role for TGF β 1 in the induction of COX-2 and PGE2 production in mink lung epithelial cells (Mv1Lu) (Saha *et al.* 1999).

In conclusion, these results characterize the expression of COX-1 and COX-2 in the non-pregnant, pregnant and pseudopregnant rat uterus and show that these two enzymes might be key factors involved in embryo implantation, decidualization, decidua *basalis* regression and parturition. Also, these enzymes might be directly or indirectly involved in the control of epithelial cell apoptosis during implantation and decidual regression and may be regulated by steroid hormones.

Acknowledgements

We are grateful to Mrs Rollande Caron and Mrs Nadia Deschênes for the contribution of their precious time and expertise to our projects.

Reference List

Chakraborty, I. et al. "Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids." *J.Mol.Endocrinol.* 16.2 (1996): 107-22.

Dai, D. and T. F. Ogle. "Progesterone regulation of epidermal growth factor receptor in rat decidua basalis during pregnancy." *Biol.Reprod.* 61.1 (1999): 326-32.

Dery, M. C. et al. "Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17beta-estradiol in the rat uterus during estrous cycle." *Reprod.Biol.Endocrinol.* 1:47. (2003): 47.

Diaz, F. J. and M. C. Wiltbank. "Acquisition of luteolytic capacity involves differential regulation by prostaglandin F2alpha of genes involved in progesterone biosynthesis in the porcine *corpus luteum*." *Domest.Anim Endocrinol.* 28.2 (2005): 172-89.

Enders, A. C. and S. Schlafke. "Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation." *Am.J.Anat.* 125.1 (1969): 1-29.

Fuchs, A. R. "Prostaglandin F2 alpha and oxytocin interactions in ovarian and uterine function." *J.Steroid Biochem.* 27.4-6 (1987): 1073-80.

Garavito, R. M. and D. L. DeWitt. "The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins." *Biochim.Biophys.Acta.* 1441.2-3 (1999): 278-87.

Hata, A. N. and R. M. Breyer. "Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation." *Pharmacol.Ther.* 103.2 (2004): 147-66.

Hla, T. et al. "Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes." *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 31.5 (1999): 551-57.

Jabbour, H. N. and S. C. Boddy. "Prostaglandin E2 induces proliferation of glandular epithelial cells of the human endometrium via extracellular regulated kinase 1/2-mediated pathway." *J.Clin.Endocrinol.Metab* 88.9 (2003): 4481-87.

Kennedy, T. G. "Prostaglandins and the endometrial vascular permeability changes preceding blastocyst implantation and decidualization." *Prog.Reprod.Biol.* 7 (1980): 234-43.

Kennedy, T. G. and H. E. Ross. "Effect of prostaglandin E2 on rate of decidualization in rats." *Prostaglandins* 46.3 (1993): 243-50.

Larkins, T. L. et al. "Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression." *BMC.Cancer.* 6:181. (2006): 181.

Leblanc, V. et al. "Opposite regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat endometrium in response to 17beta-estradiol at estrus." *Reprod.Biol.Endocrinol.* 1:59. (2003): 59.

Lim, H. et al. "Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice." *Cell.* 91.2 (1997): 197-208.

Matsumoto, H. et al. "- Diversification of cyclooxygenase-2-derived prostaglandins in ovulation and implantation." 5 -65.

Moulton, B. C. "Transforming growth factor-beta stimulates endometrial stromal apoptosis in vitro." *Endocrinology.* 134.3 (1994): 1055-60.

Ogle, T. F. and P. George. "Regulation of the estrogen receptor in the decidua basalis of the pregnant rat." *Biol.Reprod.* 53.1 (1995): 65-77.

Olofsson, J. and G. Selstam. "Changes in *corpus luteum* content of prostaglandin F2 alpha and E in the adult pseudopregnant rat." *Prostaglandins.* 35.1 (1988): 31-40.

Picot, D., P. J. Loll, and R. M. Garavito. "The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1." *Nature.* 367.6460 (1994): 243-49.

Reese, J. et al. "Coordinated regulation of fetal and maternal prostaglandins directs successful birth and postnatal adaptation in the mouse." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97.17 (2000): 9759-64.

Saha, D. et al. "Synergistic induction of cyclooxygenase-2 by transforming growth factor-beta1 and epidermal growth factor inhibits apoptosis in epithelial cells." *Neoplasia.* 1.6 (1999): 508-17.

Sharkey, A. M. and S. K. Smith. "The endometrium as a cause of implantation failure." *Best.Pract.Res.Clin.Obstet.Gynaecol.* 17.2 (2003): 289-307.

Shooner, C. et al. "TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival." *Reprod.Biol.Endocrinol.* 3:20. (2005): 20.

Simmons, D. L., R. M. Botting, and T. Hla. "Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition." *Pharmacol.Rev.* 56.3 (2004): 387-437.

Smith, M. S., M. E. Freeman, and J. D. Neill. "The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the *corpus luteum* of pseudopregnancy." *Endocrinology.* 96.1 (1975): 219-26.

St Germain, M. E. et al. "Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway." *Mol.Cancer*. 3:7. (2004): 7.

Tanaka, J. et al. "Relative changes in mRNA expression of angiopoietins and receptors tie in bovine *corpus luteum* during estrous cycle and prostaglandin F2alpha-induced luteolysis: a possible mechanism for the initiation of luteal regression." *J.Reprod.Dev.* 50.6 (2004): 619-26.

Uotila, P. J., R. U. Erkkola, and P. J. Klemi. "The expression of cyclooxygenase-1 and -2 in proliferative endometrium and endometrial adenocarcinoma." *Ann.Med.* 34.6 (2002): 428-33.

Wang, H. and S. K. Dey. "Lipid signaling in embryo implantation." *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 77.1-4 (2005): 84-102.

Wang, H. et al. "Rescue of female infertility from the loss of cyclooxygenase-2 by compensatory up-regulation of cyclooxygenase-1 is a function of genetic makeup." *J.Biol.Chem.* 279.11 (2004): 10649-58.

Welsh, A. O. "Uterine cell death during implantation and early placentation." *Microsc.Res.Tech.* 25.3 (1993): 223-45.

Welsh, A. O. and A. C. Enders. "Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degeneration." *Am.J.Anat.* 172.1 (1985): 1-29.

Welsh, A. O. and A. C. Enders. "Chorioallantoic placenta formation in the rat. III. Granulated cells invade the uterine luminal epithelium at the time of epithelial cell death." *Biol.Reprod.* 49.1 (1993): 38-57.

Williams, C. S., M. Mann, and R. N. DuBois. "The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development." *Oncogene*. 18.55 (1999): 7908-16.

Figure Legend

Figure 2.1: COX-1 mRNA and protein abundance in female rat endometrium during estrous cycle. Total endometrial mRNA and proteins were collected from polyoestrus cycling rats at each stage of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus). A) Histogram shows quantitative real time RT-PCR densitometric analysis of COX-1 normalized to GAPDH to control for protein loading. Data represents the mean \pm SEM of three independent experiments (three different rats). Columns with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). B) Endometrial proteins were subjected to Western blot analysis of COX-1 content. Representative blot is shown. Histogram shows densitometric analysis of COX-1 normalized to β -actin to correct for protein loading; data represents the mean \pm SEM of B) four independent experiments. Columns with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Figure 2.2: COX-1 mRNA and protein abundance in female rat endometrium during pregnancy at different days. Total endometrial ARNm and proteins were collected at indicated days of pregnancy and subjected to real time RT-PCR analysis and Western blot analysis of COX-1 content. A) and B): Histograms show quantitative real time RT-PCR densitometric analysis of COX-1 during A) early and B) late pregnancy normalized to GAPDH to control for protein loading. Data represents the mean \pm SEM of three independent experiments (three different rats). Columns with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). C) and D): COX-1 protein expression in female rat endometrium during early and late pregnancy. Representative blots are shown. Histograms show densitometric analysis of COX-1 normalized to β -actin to correct for protein loading; data represents the mean \pm SEM of C) four independent experiments and D) three independent experiments. Columns with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Figure 2.3: COX-1 mRNA and protein expression in female rat endometrium during pseudopregnancy. The mRNA was subject to real time RT-PCR analysis for COX-1 content. A) Histogram shows quantitative real time RT-PCR densitometric analysis of COX-1 during pseudopregnancy normalized to GAPDH to control for protein loading. Data represents the mean \pm SEM of three independent experiments (three different rats). Columns with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). The proteins were subject to Western blot analysis of COX-1 content. B) Representative blot is shown. Histogram shows densitometric analysis of COX-1 normalized to β -actin to correct for protein loading; data represents the mean \pm SEM of three independent experiments. Columns with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Figure 2.4: COX-2 protein abundance in female rat endometrium during estrous cycle. Total endometrial proteins were collected from polyoestrus cycling rats at each stage of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus). Endometrial proteins were subjected to Western blot analysis of COX-2 content. Representative blot is shown. Histogram shows densitometric analysis of COX-2 normalized to β -actin to correct for protein loading; data represents the mean \pm SEM of three independent experiments. Columns with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Figure 2.5: COX-2 expression in female rat endometrium during A) early and B) late pregnancy. Total endometrial proteins were collected at indicated days of pregnancy and subjected to Western blot analysis of COX-2 content. Representative blots are shown. Histograms show densitometric analysis of COX-2 normalized to β -actin to correct for protein loading; data represents the mean \pm SEM of A) three and B) three independent experiments. Columns with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). COX-2 expression in female rat endometrium during

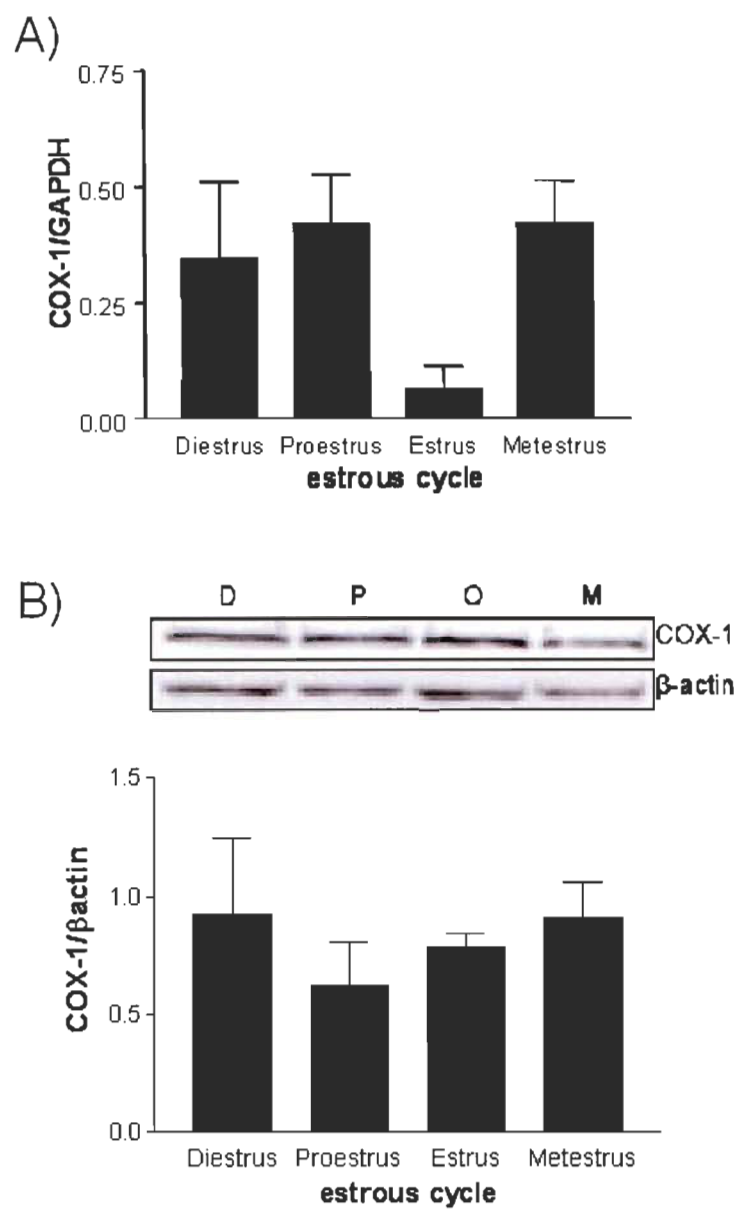
Figure 2.6: COX-2 protein expression in female rat endometrium during pseudopregnancy. The proteins were subject to Western blot analysis of COX-2 content. B) Representative blot is shown. Histogram shows densitometric analysis of COX-2 normalized to β -actin to correct for protein loading; data represents the mean \pm SEM of three independent experiments. Columns with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Figure 2.7: Immunoreactivity of COX-1 in rat endometrium during pregnancy and estrous cycle. COX-1 localization (brown color) was assessed in rat endometrium during pregnancy (days 5.5 and 20) and estrous cycle (at proestrus) using IHC. Tissues were counterstained with haematoxylin. For negative control (ctrl) primary antibody was replaced by normal rabbit IgG. Results are representative of 3 independent experiments. Magnification: 200X

Figure 2.8: Immunoreactivity of COX-2 in rat endometrium during pregnancy and estrous cycle. COX-2 localization (brown color) was assessed in rat endometrium during pregnancy (days 5 and 8) and estrous cycle (at estrus) using IHC. Tissues were counterstained with haematoxylin. For negative control (ctrl) primary antibody was replaced by normal rabbit IgG. Results are representative of 3 independent experiments. Magnification: 200X

Figure 2.9: PGE2 metabolites concentrations in serum from A) pregnant rats B) pseudopregnant rats and C) from polyoestrus cycling rats at each stage of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus). Serum samples were collected at indicated days of pregnancy and the metabolites were measured using a high sensitivity enzyme immunoassay (EIA) kit. *Significantly different from all other days of pseudopregnancy ($p < 0.05$).

Figure 2.10: PGF2 α metabolites concentrations in serum from A) pregnant rats B) pseudopregnant rats and C) from polyoestrus cycling rats at each stage of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus). Serum samples were collected at indicated days of pregnancy and the metabolites were measured using a high sensitivity enzyme immunoassay (EIA) kit. *Significantly different from all other days of pseudopregnancy ($p < 0.05$).

**FIGURE 2.1****St-Louis et al.**

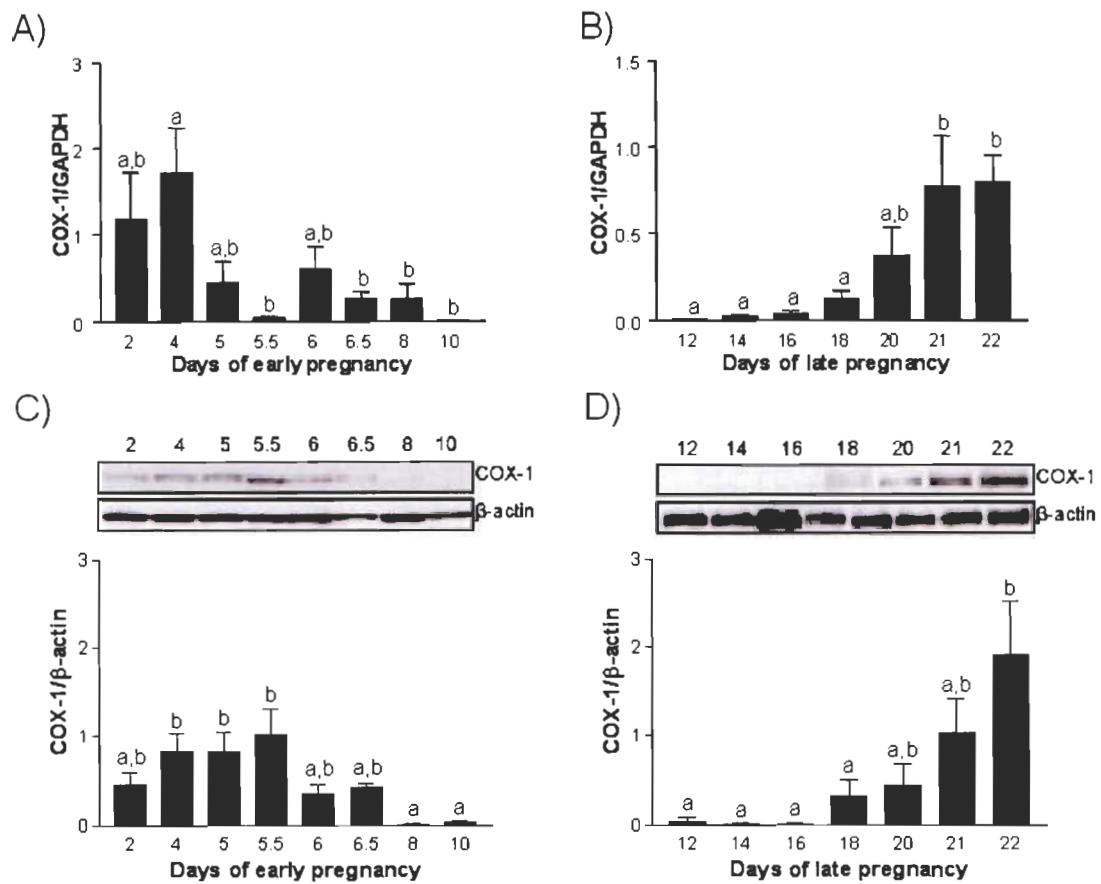


FIGURE 2.2

St-Louis et al.

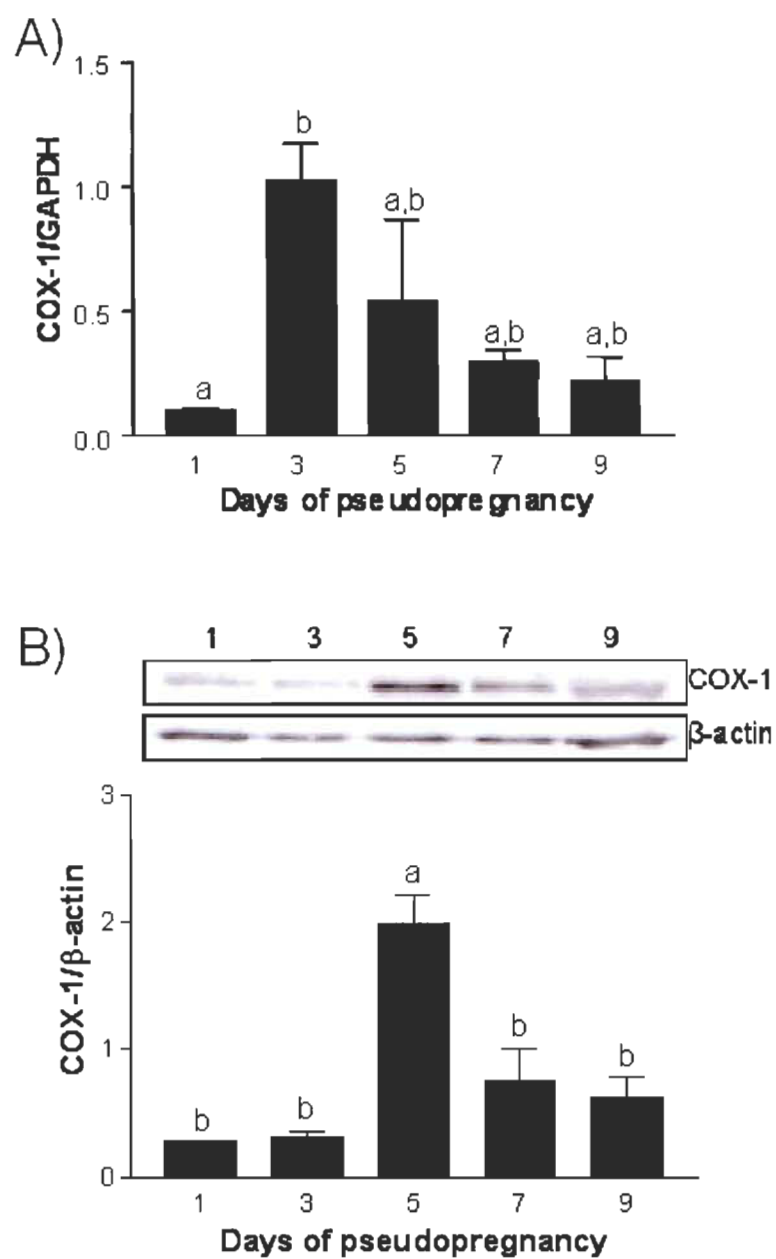


FIGURE 2.3

St-Louis et al.

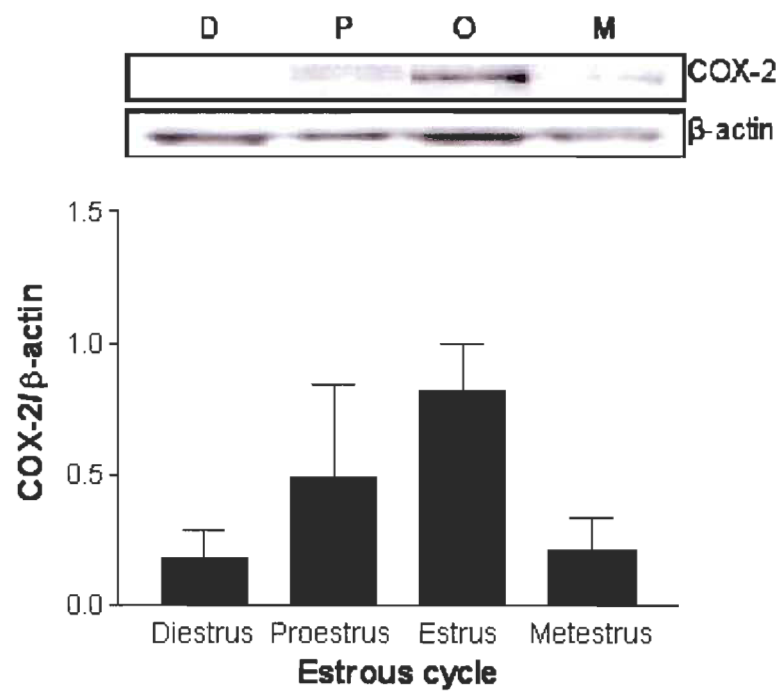


FIGURE 2.4

St-Louis et al.

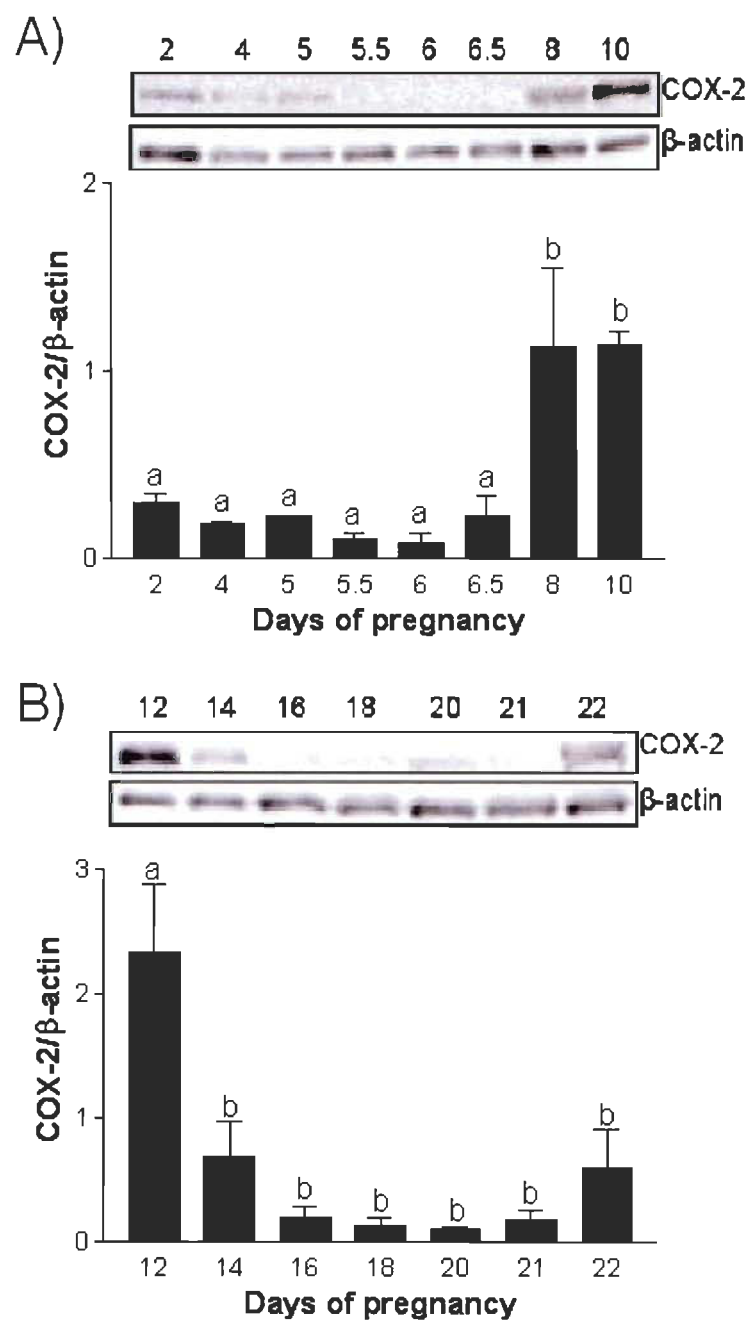


FIGURE 2.5

St-Louis et al.

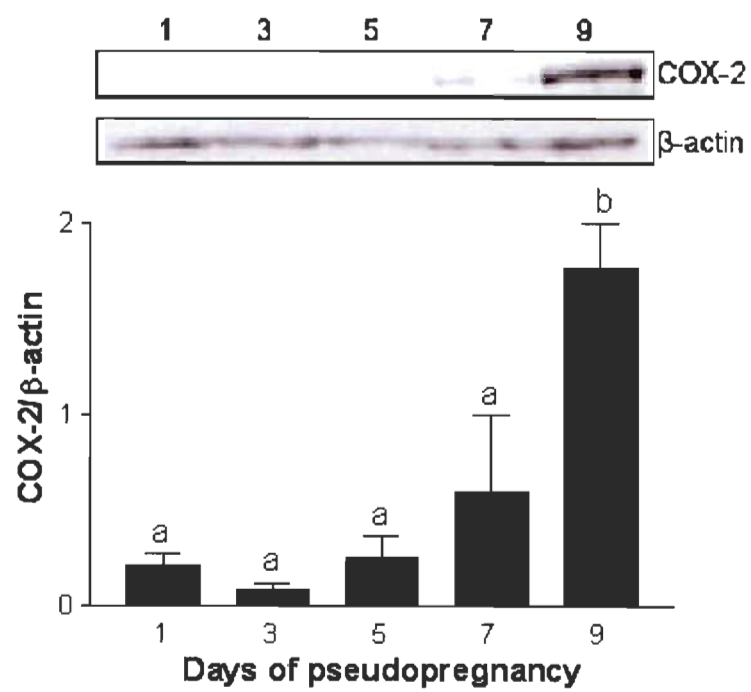


FIGURE 2.6

St-Louis et al.

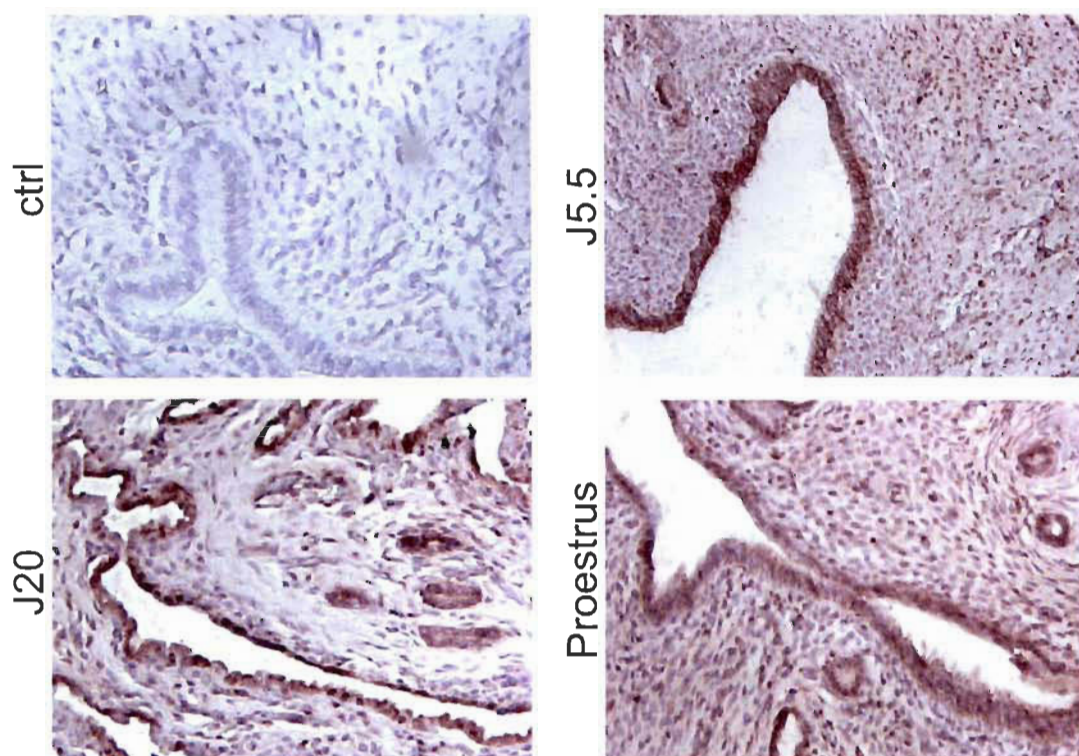


FIGURE 2.7

St-Louis et al.

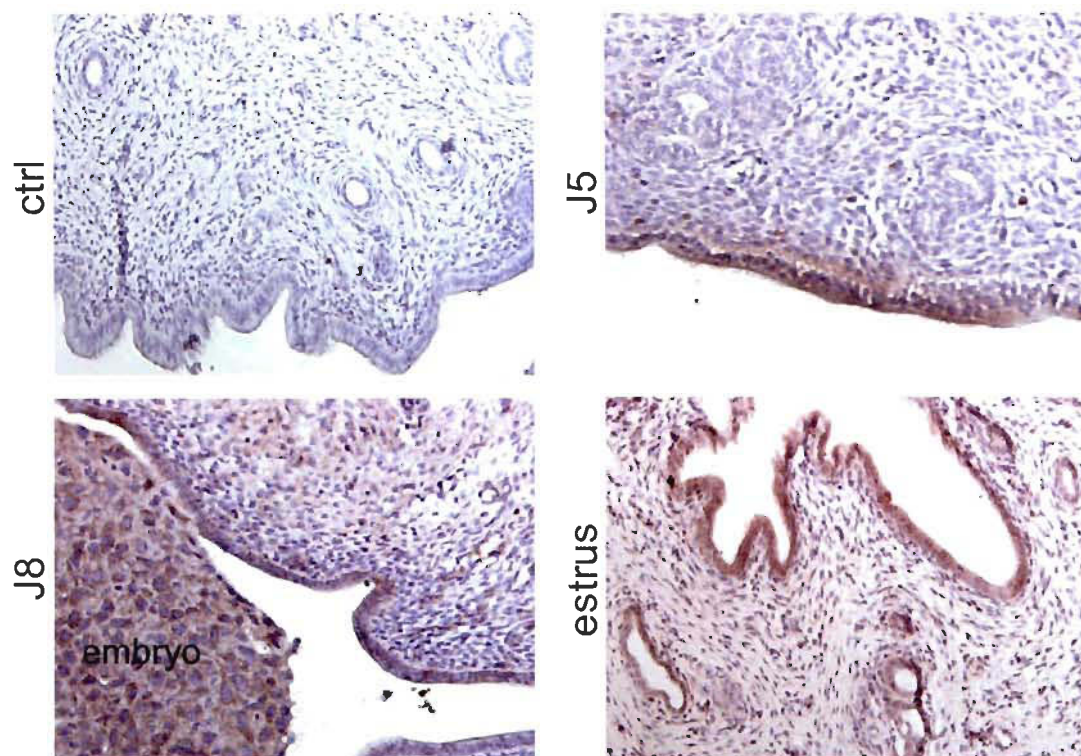


FIGURE 2.8

St-Louis et al.

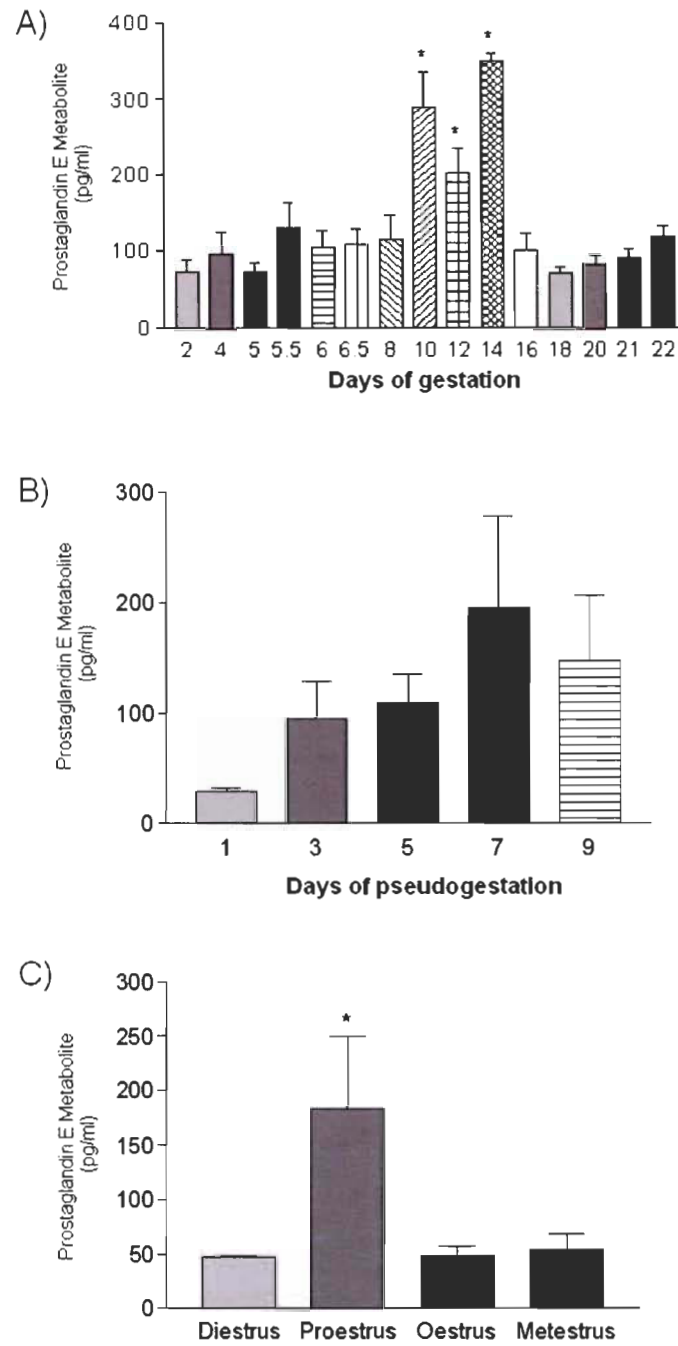


FIGURE 2.9

St-Louis et al.

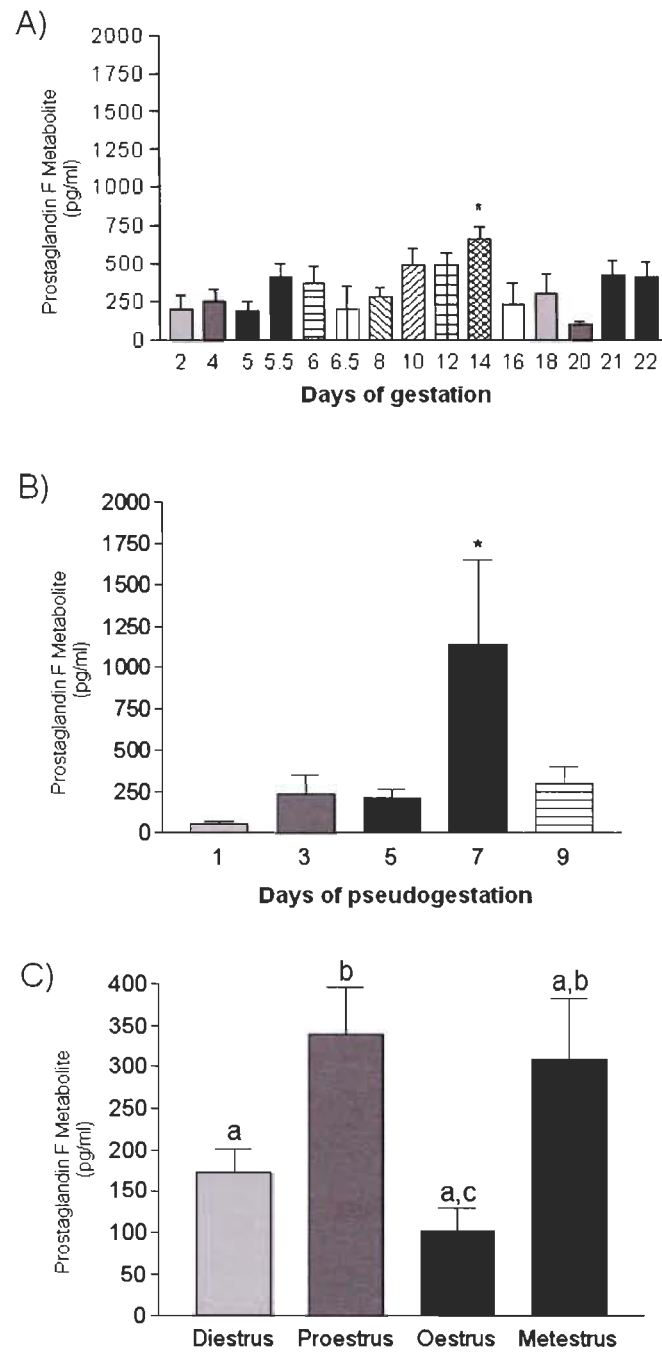


FIGURE 2.10

St-Louis et al.

CHAPITRE 3

ARTICLE 2

3.1 PRÉFACE

Les auteurs du chapitre 3 sont : Junie Hurette Chansi Kengni, 1^{er} auteur, elle a effectué une partie des expérimentations, le traitement de données et la rédaction de l'article, Isabelle St-Louis 2^e auteur, j'ai participé à une partie des expérimentations dont l'immunohistochimie, Sophie Parent 3^e auteur, à l'obtention des résultats pour le figures 6 et 7 du présent chapitre, Valérie Leblanc et Carl Shooner qui sont respectivement les 4^e et 5^e auteurs, les deux ont participé à l'obtention des échantillons d'utérus de rates et finalement, Éric Asselin, dernier auteur, qui a élaboré la stratégie expérimentale, effectué la supervision des travaux et aussi la révision de l'article. Cet article a été publié en 2007 dans la revue Journal of Endocrinology (Kengni et al. 2007).

3.2 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

3.2.1 Objectifs de l'étude

Les prostaglandines sont des médiateurs lipidiques dérivant de l'acide arachidonique qui sont impliqués dans la régulation de plusieurs processus physiologiques dont les fonctions reproductives. La synthèse des PGs débute par la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines endoperoxyde (PGH₂) via une enzyme nommé cyclooxygénase (COX). La régulation de même que la présence des PGs lors de la gestation chez la rate n'est pas totalement connue à ce jour. L'objectif de la présente étude était de caractériser l'expression de la prostaglandine D synthase (PGDS) ainsi que la prostacycline synthase (PGIS) dans l'endomètre de la rate.

3.2.2 Méthodes

Pour cette étude, des rates de type Sprague-Dawley (200–225 g) ont été utilisées. Les rates ont été sacrifiées et leur utérus prélevé à différents jours de la gestation (jours 2 à 22), de la pseudogestation (jours 1 à 9) et aux différents stades du cycle oestral (diestrus, proestrus, oestrus et métestrus). Les protéines et l'ARN ont été extraits et utilisés respectivement pour des analyses Western Blot et RT-PCR en temps réel. Des sections de tissus ont également été utilisées afin de localiser les protéines en effectuant des analyses immunohistochimiques. La quantification des métabolites de PGD2 et PGI2 dans le sérum a été réalisée par ELISA.

3.2.3 Résultats

PGIS et PGDS ont été détectés dans l'endomètre de la rate durant la gestation, la pseudogestation et aussi durant le cycle oestral. PGIS était fortement présente en début de gestation et plus particulièrement au jour 5 et diminuait graduellement du jour 5.5 à 6.5. Le niveau de PGIS était maximal au jour 12 et diminuait jusqu'à la fin de la gestation. Quant à PGDS, son expression était élevée en début de gestation et maximale lors de la parturition. Durant la pseudogestation, le niveau de PGDS et PGIS était maximal au jour 5. Les analyses ELISA ont révélé que le métabolite de PGI2 était maximal au jour 7 de la pseudogestation. Les études d'immunohistochimie ont révélé la présence des deux enzymes dans l'épithélium luminal et glandulaire de l'utérus et aussi dans le stroma en fin de gestation. Une hausse significative du métabolite de PGD2 a également été détectée dans le sérum de la rate aux jours 21 et 22 de gestation.

3.2.4 Conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette étude suggèrent que PGDS et PGIS sont présents dans l'utérus de la rate gestante et pourraient être régulés par les hormones stéroïdiennes. De plus, les résultats obtenus démontrent que l'endomètre peut être une source importante de PGD2 et PGI2 à des étapes précises de la gestation.

3.3 ARTICLE

REGULATION OF PROSTAGLANDIN D SYNTHASE (PGDS) AND PROSTACYCLIN SYNTHASE (PGIS) IN THE ENDOMETRIUM OF CYCLIC, PREGNANT AND PSEUDOPREGNANT RATS AND THEIR REGULATION BY SEX STEROIDS

Junie Hurette Chansi Kengni, Isabelle St-Louis, Sophie Parent, Valérie Leblanc, Carl Shooner and Eric Asselin*

Département de Chimie-Biologie, Groupe de Recherche en Biopathologies Cellulaires et Moléculaires, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

Short title: PGDS and PGIS expression in the rat endometrium.

Key Words: Prostaglandin D, prostacyclin, PGD synthase, prostacyclin synthase, apoptosis, pregnancy.

*Corresponding Author: Eric Asselin, Ph.D.
Département de Chimie-Biologie
Section Biologie Médicale
Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500
Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7
E-mail: Eric.Asselin@uqtr.ca

† This work has been supported by a grant from NSERC (238501-01). Eric Asselin is holder of the Canada research chair in Molecular Gyneco-oncology. We are grateful to Mrs Rollande Caron for the contribution of her precious time and expertise to our projects. We also thank Mrs Daphne Efford and Dr Céline Van Themsche for reviewing the manuscript.

Abstract

Prostaglandins (PGs) are critical regulators of a number of reproductive processes. To date, the presence and regulation of PGs in the rat endometrium have not yet been described. The objective of the present study was to investigate the expression of PGD synthase (PGDS) and prostacyclin synthase (PGIS) in the endometrium. Endometrial proteins and tissues were collected from cyclic non-pregnant, pregnant, and steroid-induced pseudopregnant rats. PGIS and PGDS were detected in the endometrium of cyclic, pregnant, and pseudopregnant rats but were not influenced by the estrous cycle. During early pregnancy, PGIS was significantly higher at day 5 and was gradually decreased from day 5.5 to 6.5. Later during pregnancy, PGIS was maximal on day 12 and gradually decreased to the end of pregnancy. PGDS expression was high during early and was maximal at the end of pregnancy. During pseudopregnancy, PGDS and PGIS were increased in a time-dependent manner and were maximal at day 5. Immunohistochemical analysis revealed that PGDS and PGIS were found in luminal as well as glandular epithelial cells and in stroma during late pregnancy. We also found a significant increase of PGD₂ serum metabolite at days 21 and 22 of pregnancy. During steroid-induced pseudopregnancy, PGI₂ serum metabolite was increased in a time-dependent manner and was maximal at day 7. These results suggest that PGDS and PGIS are present and could be regulated by steroids in the rat uterus during pregnancy, and that the endometrium could be a significant source of PGD₂ and PGI₂ at specific times during pregnancy.

Introduction

Prostanoids, which consist of prostaglandins (PGs) and thromboxanes (TXs), exert a variety of effects in diverse tissues and cell types. These prostanoid products are derived from C-20 unsaturated fatty acids and biosynthesized by PGH synthases (Narumiya *et al.* 1999). PGH synthases catalyze the formation of PGH₂ from arachidonic acid. Newly formed PGH₂ is subsequently converted to what are considered to be the biologically active prostanoids, PGD₂, PGE₂, PGF₂α, TXA₂, or PGI₂. There are two PGH synthase isoforms called PGHS-1 (cyclooxygenase(COX)-1) and PGHS-2 (COX-2). These two isoforms share important similarities at the protein level; they are approximately the same size (70–72 kDa), and the important structural and functional domains are highly conserved (Xie *et al.* 1991, Williams & DuBois 1996). However, PGHS-1 and PGHS-2 transcripts are encoded by distinct genes located on different chromosomes and differ in size (Xie *et al.* 1991, Williams & DuBois 1996). PGHS-1 is a constitutive enzyme present in many mammalian cells (Kraemer *et al.* 1992, Kujubu & Herschman 1992, Kennedy 1994) and its expression appears to be regulated developmentally (Kirihaara *et al.* 2005). PGHS-2 is undetectable in most mammalian tissues (Kennedy 1994), but its expression can be induced by growth factors, cytokines, and tumor promoters (Simmons *et al.* 1991, Evett *et al.* 1993, O'Neill & Ford-Hutchinson 1993).

PG receptors were identified and cloned in different species. They are G-protein-coupled receptors with seven transmembrane domains. There are eight types and subtypes of prostanoid receptors that are encoded by different genes but as a whole constitute a subfamily in the superfamily of the rhodopsin-type receptors. Receptors specific for TX, PGI, PGE, PGF, and PGD are named thromboxane A₂ receptor (TP), prostacyclin receptor (IP), (prostaglandin E₂ receptor EP; four different types identified EP1, EP2, EP3, and EP4), prostaglandin F_{2a} receptor (FP), and D prostanoid receptor (DP) receptors respectively (DeWitt & Meade 1993, Coleman *et al.* 1994, Narumiya *et al.* 1999). It is believed, therefore, that PGs work locally (or closely to their site of production, i.e. originate from the uterus and act on the ovary), acting only at the site of

their production (Narumiya *et al.* 1999). The presence and regulation of EPs and FP receptors were found to be regulated by sex steroids in the mouse (Yang *et al.* 1997) and rat uterus (Martel *et al.* 1989, Papay & Kennedy 2000, Shi *et al.* 2005).

In the rat uterus, attachment and invasion of embryonic trophoblast is accompanied by decidualization of the adjacent endometrial stroma. Decidualization involves the proliferation and differentiation of endometrial stromal cells into decidual cells, which ultimately form the maternal component of the placenta and is necessary for the successful establishment of pregnancy (Abrahamsohn & Zorn 1993). Decidualization can be initiated only when the endometrium is receptive, and this only occurs during a short period in pregnancy. Several decades of investigations have showed that PGs are needed to trigger the events of blastocyst implantation. Implantation processes include blastocyst–uterine attachment and stromal decidualization with vascular permeability changes (Rankin *et al.* 1979, Kennedy 1983). Indeed, Kennedy's group and others have showed that PGE₂ plays a major role in the implantation and decidualization in the rodent uterus (Zhang *et al.* 1996). COX-2 and PGE₂ have also been shown to be important in the baboon endometrium at the time of implantation (for a review, see Fazleabas *et al.* (1999)). Later, S K Dey's group established PGI₂ as a key mediator in the process of implantation and decidualization in the mouse via the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) δ and retinoid-x receptor (RXR) α signaling pathway (Lim *et al.* 1999). They also showed that PGI₂ is the most abundant PG at the implantation sites (Lim *et al.* 1999). Another group showed that insulin-like growth factor-binding protein related protein-1 renders the uterine environment suitable for successful implantation by enhancing PGI₂ production in a paracrine and/or autocrine fashion in the rat uterus (Tamura *et al.* 2004), indicating that might be an important factor for successful establishment of pregnancy.

PGD₂ is synthesized by the PGD synthase (PGDS) enzyme and induces sleep, allergic responses, inhibition of platelet aggregation, and relaxation of vascular and non-vascular smooth muscle, and has some roles in reproduction. Two types of PGD₂ synthase are known: lipocalin-type PGDS (L-PGDS) and hematopoietic PGDS (H-

PGDS; Coleman *et al.* 1990, 1994). L-PGDS is an *N*-glycosylated dual functional monomeric protein which acts as a PGD₂-producing enzyme, as well as a lipophilic ligand-binding protein. L-PGDS is present in cerebrospinal fluid, seminal plasma and may play an important role in male reproduction. H-PGDS is a cytosolic enzyme that isomerizes PGH₂ to PGD₂ in a glutathione-dependent manner (Coleman *et al.* 1990, Urade & Eguchi 2002). H-PGDS is present in the spleen, fallopian tube, endometrial gland cells, extravillous trophoblasts, and villous trophoblasts, and perhaps plays an important role in female reproduction (Urade & Eguchi 2002, Kanaoka & Urade 2003). PGI₂ or prostacyclin is synthesized by the PGI synthase (PGIS) enzyme and has roles over and above relaxation in the lower uterine segment. PGIS is a membrane-bound hemoprotein that has been localized by immunohistochemical (IHC) techniques in endothelial cells and both vascular and in non-vascular smooth muscle cells (Giannoulas *et al.* 2002, Saito *et al.* 2002). PGIS is expressed in human myometrial smooth muscle (Tanabe & Ullrich 1995). In the mouse, COX-2 and PGIS coexist at the implantation site, suggesting the availability of PGI₂ directly to uterine cells (for a review, see Lim & Dey (2002)).

The expression and regulation of PGDS and PGIS has never been described in the non-pregnant, pseudopregnant, and pregnant rat endometrium. Since these PG synthases might play a significant role in the production of PGI₂ and PGD₂, we investigated the expression of these enzymes and the possibility that they might be regulated by sex steroids during the estrous cycle, pregnancy, and in a model of pseudopregnancy.

Material and Methods

Reagents

PGDS and PGIS antibodies were purchased from Oxford Biomedical Research (Oxford, MI, USA). PGD₂ metabolite 11-β-PGF_{1α} and PGI₂ metabolite 6-keto-PGF_{1α} were purchased from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). Vectastain ABC Kit for rabbit IgG was purchased from Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA).

Protease Inhibitor Cocktail Tablets, peroxidase (POD), and 3,3¹-diaminobenzidine (DAB) substrate were purchased from Roche. 17 β -Estradiol (E₂) and progesterone were purchased from Laboratoire Mat (Québec, QC, Canada).

Animals

Sprague–Dawley female rats (200–225 g) were obtained from Charles River Laboratories Canada. Animals were maintained on standard chow and water, which were available *ad libitum*, in animal facilities illuminated between 0600 and 2000 h. All procedures were performed in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care for the handling and training of laboratory animals and the Good Health and Animal Care Committee of the Université du Québec à Trois-Rivières. Male and female rats were mated overnight and confirmation of mating was determined by vaginal smears and/or the presence of a vaginal plug (day 1). Rats were killed on days 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 21, and 22 of pregnancy at 1000 h in the morning and at 1800 h for days 5.5 and 6.5. Six to eight different rats were used for each stage of pregnancy. For the estrous cycle experiments, stages of the estrous cycle were confirmed by vaginal smears. Rats with three regular cycles of 4 days were used in these experiments and killed at various stages of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus, and metestrus). Uteri were collected and fixed for IHC staining or endometrial protein extracts were collected for western blot analysis.

Model of pseudopregnancy

A total of three rats per day of pseudopregnancy were ovariectomized and then allowed to recover from surgery for a minimum of 10 days. They were pre-treated with physiological doses of E₂ and progesterone to induce decidualization as described previously (Kennedy & Ross 1993): 1) 0.2 μ g E₂ per day for 3 days (in the morning, days –2, –1, and 0); 2) on the third day (day 0 of pseudopregnancy), another injection of E₂ (0.2 μ g) and progesterone (1 mg) was performed in the afternoon; 3) no treatment for 2 days (days 1 and 2 of pseudopregnancy); 4) injections of E₂ (0.1 μ g) and progesterone (4 mg) for 3 days (days 3, 4, and 5 of pseudopregnancy); 5) another injection of E₂ (0.1

µg) in the afternoon on day 7 (day 4 of pseudopregnancy); and 6) rats were killed on days 1, 3, 5, 7, and 9 of pseudopregnancy. Uteri were collected and fixed for IHC staining or endometrial protein extracts were collected for western blot analysis.

Immunohistochemistry

The uterus was fixed in 4% paraformaldehyde solution and embedded in paraffin. Tissue sections of 7 µm thick were mounted on polylysine-coated slides, deparaffinized, rehydrated, and then heated in 10 mM citrate buffer (pH 6) containing 0.1% (v/v) Triton X-100 (Sigma–Aldrich). After two washes with PBS, slides were incubated with 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 30 min to quench endogenous peroxidase activity. After washing with PBS, tissues were incubated with blocking serum (Vectastain ABC Kit) at room temperature for 1 h. Then, a primary antibody diluted in blocking serum (PGIS, 1:250; PGDS, 1:500 dilutions) was added to the slides and incubated at 4 °C overnight in a humidified chamber. After washing for 5 min in PBS, tissue sections were incubated for 30 min with 3 µg/ml biotinylated antibody (anti-rabbit or anti-mouse). Subsequently, slides were washed with PBS and incubated with avidin–biotin complex reagent containing horseradish peroxidase for 30 min. Slides were washed with PBS for 5 min and color development was achieved using DAB substrate. The tissue sections were counterstained with hematoxylin. Negative controls (day 20 tissue sections) were performed using the same protocol but substituting the primary antibody with normal rabbit IgG (Vector Laboratories Inc).

Protein extraction and Western analysis

Protein homogenates from pregnant endometrium were isolated according to a protocol previously described (Dai & Ogle 1999). Briefly, uteri from days 2 to 20 pregnant rats were rapidly excised and placed in ice-cold saline until dissected. Uteri were carefully laid on a glass plate and placed on the stage of a dissecting microscope. In early pregnancy (days 2–5.5), total endometrium was scraped using a microscope glass and collected. Endometrium from days 6 to 10, because the placenta and decidua were at an early stage of differentiation, could not be separated. For this reason, decidua basalis

(DB) dissected from animals between these days of pregnancy contained some chorioallantoic cells, but antimesometrial decidua, choriovitelline tissues, fetus, and myometrium were removed. Even though we carefully dissected DB from these tissues, there was a possibility that contamination with some antimesometrial decidual cells, which regress to form the deciduas capsularis (DC), would occur. In uteri collected from days 12 to 20, DB was isolated by gently separating the placenta and myometrial regions with 23-gauge needles. Additionally, the DB began to regress on day 14 and became too thin to reliably dissect after day 17. The protocol for DB isolation was described previously by Ogle & George (1995).

Endometrial cells from pregnant animals were homogenized using a pipette in RIPA lysis buffer (PBS 1X, pH 7.4; 1% nonidet P-40; 0.5% sodium deoxycholate; 0.1% SDS; Protease Inhibitor Cocktail Tablets). Homogenates were centrifuged (12 000 *g* for 20 min at 4 °C) to remove insoluble material. The supernatant was recovered and stored at -20 °C pending analysis. Protein content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay. Protein extracts (50 µg) were heated at 94 °C for 3 min, resolved by 10% SDS-PAGE, and electrotransferred to nitrocellulose membranes using a semi-dry transfer apparatus (Bio-Rad). The membranes were then blocked 2 h at room temperature with PBS containing 5% milk powder, then incubated with anti-PGDS 1:1000; and anti-PGIS 1:8000, and subsequently with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibody respectively (1:3000; room temperature for 45 min). All membranes were stripped with restore western blot stripping buffer (Pierce, Arlington Heights, IL, USA), reprobed with an antibody specific to β -actin which was used as an internal standard. Peroxidase activity was visualized with the Super signal West Femto maximum sensitivity substrate (Pierce), according to manufacturer's instructions. Signal was visualized using the Biochemi Imaging System (UVP, CA, USA). Densitometrical analyses were performed (protein of interest and β -actin) using Quantity One software (Bio-Rad). Results are expressed as a ratio (protein of interest/ β -actin) to correct for loading for each endometrial sample.

Prostaglandins metabolites enzyme immunoassay

The animals were killed using a guillotine and blood was collected at the same time ($n = 4$ samples per group). After collection from the animals, blood was allowed to clot for 30–60 min at 37 °C. The serum was then separated from the clot and any remaining insoluble material removed by centrifugation at 2799 *g* for 10 min at 4 °C. After preparation, sera were kept at –80 °C until further use. EIAs for PG metabolites were used according to manufacturer's instructions (Cayman Chemicals). Briefly, 50 μ l serum obtained during experimentation were used for each of the PGD₂ and PGI₂ metabolites in 96-well plates coated with goat anti-rabbit IgG antibodies. The metabolite tracer (50 μ l) and the metabolite-specific antibody (50 μ l) were added to each well. The plates were incubated overnight at 4 °C or room temperature depending on the metabolite. Then, wells were washed five times with 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing Tween 20 (0.05%) at pH 7.4, and 200 μ l Ellman's reagent (69 mM acetylthiocholine and 54 mM 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4) were added to each well; plates were incubated in the dark at room temperature for 60–90 min. This allowed the bound enzyme tracer to react with Ellman's reagent to yield a yellow solution that could be measured photometrically with a microplate reader at 420 nm. A standard curve was developed simultaneously with standards of the PG metabolites, and determination of metabolite concentrations relative to those standards was calculated. Samples were assayed in triplicates.

Statistical analysis

Western blot analyses of cycling, pregnant, and pseudopregnant animals were repeated four times (four different rats). Endometrial extracts from each rat were assessed individually. Results subjected to statistical analysis were expressed as mean \pm s.e.m. Data were subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 4.0; GraphPad, San Diego, CA, USA). Differences between experimental groups were determined by Tukey's test. Statistical significance was accepted when $P < 0.05$.

Results

PGDS and PGIS are expressed in the female rat endometrium during the estrous cycle

PGD₂ and PGI₂ expression in the endometrium during the estrous cycle, pregnancy or pseudopregnancy remains unknown. We have found that PGDS and PGIS proteins were indeed present in the rat endometrium, at all stages of the estrous cycle (Fig. 3.1). However, the levels of PGDS and PGIS were not influenced by the estrous cycle (metestrus, diestrus, estrus, and proestrus), indicating that both enzymes might play a role in the maintenance of uterine function but are not regulated during this period in the absence of embryo.

Expression of PGIS and PGDS is regulated in the pregnant rat endometrium

To document the regulation of PGIS and PGDS enzymes in the uterus during pregnancy, western blot and IHC analyses were performed on uterine lysates and sections of pregnant rats. Immunodetection of PGIS by western blot resulted in a band with a molecular mass of 51 kDa (Fig. 3.2), while immunodetection of H-PGDS resulted in a single band with a molecular mass of 25 kDa (Fig. 3.3). We found that PGIS as well as PGDS was present in the rat uterus at all days of pregnancy. Noteworthy, protein levels of both enzymes were significantly maximal at day 5 of early pregnancy, suggesting a possible role for PGIS and PGDS in trophoblast implantation. The levels of PGIS also increased at days 12, 14, and 16 of pregnancy, which coincides with the initiation of DB regression, while the expression levels of PGDS gradually increased from day 12 to peak at day 20, suggesting another role for this enzyme in the preparation for parturition. L-PGDS was not detected in the endometrial protein extracts (data not shown). These results suggest that PGIS and PGDS are similarly regulated in the rat uterus throughout pregnancy, except in the days preceding parturition where PGDS would play a prominent role.

Expression of PGDS and PGIS in the model of pseudopregnancy

Since we have showed that PGDS and PGIS are regulated during pregnancy but not during the estrous cycle, we hypothesized that their expression could be influenced by sex steroids in a longer period of exposure as what is observed in true pregnancy. Indeed, in pseudopregnant uterus of rats stimulated with E₂ and progesterone, PGDS and PGIS protein expressions were stimulated in a similar fashion (Fig. 3.4). The expression levels of both enzymes were increased significantly in a time-dependent manner from days 1 to 5 of steroid-induced pseudopregnancy and were significantly reduced at days 7 and 9. These results suggest that sex steroids influence the expression levels of PGDS and PGIS in the rat uterus in a similar situation as true pregnancy.

Localization of PGDS and PGIS proteins in rat endometrium by IHC

To localize PGDS and PGIS proteins, uterine tissues from pregnant rats were sectioned and IHC analysis was performed (Fig. 3.5). The results showed that both enzymes were expressed in luminal and glandular endometrial epithelial cells during pregnancy and expression was observed weakly in the stroma during late pregnancy.

Measurement of prostaglandins metabolites by enzyme immunoassay (EIA)

To confirm the possible activity of PGDS and PGIS on the production of PGD₂ and PGI₂ in the rat endometrium, their metabolites (11 β -PGF₂ α and 6-keto-PGF₁ α respectively) were measured in the rat sera during the estrous cycle (Fig. 3.6A and B), pregnancy (Fig. 3.6C and D), and pseudopregnancy (Fig. 3.7). PGE₂ (PGEM) and PGF₂ α (13,14-dihydro-15-keto-PGF₂ α) metabolites were also measured at the same time. We found an inverse relationship between the levels of PGE₂ and PGI₂ metabolites, but no significant change in PGD₂ metabolite levels, during the estrous cycle. In addition, there was a significant increase of PGE₂ and PGF₂ α metabolites at proestrus and a decrease of PGI₂ metabolite at proestrus ($P < 0.05$). During early pregnancy (Fig. 3.6), the results showed a significant increase of PGE₂ metabolite on day 5.5 and an increase of PGI₂ but not PGD₂ metabolite on day 6. During late pregnancy, the results showed a significant

increase of PGD₂, but not PGI₂, metabolite on days 21 and 22. An increase of PGE₂ and of PGF₂α metabolites was observed during DB regression on days 10, 12, and 14 ($P < 0.05$). PGF₂α metabolites were also increased at days 21 and 22 of pregnancy. During pseudopregnancy (Fig. 3.7), PGE₂ and PGI₂ metabolites were increased in a similar fashion: the metabolites were increased in a time-dependent manner and were maximal on day 7 of pseudopregnancy. PGF₂α metabolite was significantly ($P < 0.05$) increased at day 7 of pseudopregnancy when compared with all other days measured, while systemic levels of PGD₂ metabolite were not influenced by the pseudopregnancy.

Discussion

Successful implantation is the result of reciprocal interactions between the implantation-competent blastocyst and receptive uterus, which is a multistep process including apposition of the blastocyst to the uterine luminal epithelium, adhesion to the epithelium, penetration through the epithelium and basal lamina, and invasion into the stromal vasculature (Enders *et al.* 1986). Due to the impracticalities of studying implantation in humans, implantation has been studied in mice and rats (Dey *et al.* 2004), guinea pigs (Enders & Schlafke 1969, Enders 2000), rabbits (Enders & Schlafke 1971, Hoffman *et al.* 1998), sheep (reviewed in Gray *et al.* 2001), and pigs (Bazer 1975, Geisert & Yelich 1997, Burghardt *et al.* 2002). Because PGs have been implicated in the implantation process (Dey *et al.* 2004), ovulation, fertilization, and parturition in different species, we hypothesized that PGDS and PGIS might also be important regulators of uterine function and contribute to the production of other key PGs such as PGD₂ and PGI₂. The present data are the first to show the presence, activity, and regulation of PGDS and PGIS in the pregnant, pseudopregnant, and the non-pregnant rat uterus.

During the estrous cycle, death of uterine cells occurs. It has been shown that apoptotic death was low at proestrus and increased at estrus (Sandow *et al.* 1979, Dery *et al.* 2003, Leblanc *et al.* 2003). This phenomenon is closely associated with the concentrations of ovarian steroids, which increase from diestrus to proestrus and

decrease at estrus (Smith *et al.* 1975). We have demonstrated that PGDS and PGIS enzymes were present at elevated levels that remained unchanged in rat uterus throughout the estrous cycle, suggesting that their respective products PGD₂ and PGI₂ exert possibly important roles in uterine function and/or homeostasis. In accordance, we have measured constant levels of PGD₂ metabolite in rat sera during the estrous cycle. Systemic levels of PGI₂ metabolite however, which was the most abundant of all PG metabolites in the rat sera, was not constant during the estrous cycle as it was markedly decreased at proestrus, indicating that the source of increased PGI₂ might not originate from the uterus. Our results have also highlighted an inverse relationship between systemic levels of PGI₂ and PGE₂ metabolites during the estrous cycle (data not shown). In this regard, recent studies have showed that PGE₂ induces proliferation of human endometrial epithelial cells (Jabbour & Boddy 2003); the significant increase of PGE₂ metabolite at proestrus may suggest its implication in cellular proliferation as seen in the endometrium during this period preceding embryo implantation, and argues for an anti-proliferative function for PGI₂, as previously described (Kothapalli *et al.* 2003, 2004).

Our results also demonstrate that PGDS and PGIS are expressed in the endometrium of pregnant female rats throughout gestation, suggesting that local production of PGD₂ and PGI₂ might be important in the regulation of endometrial function. The increase of PGIS and PGDS levels at the time of establishment of pregnancy and implantation (days 5–7) and during regression of the DB (days 14–20) suggests a possible implication of these two PGs in these key stages of gestation. PGDS protein, which is high during early pregnancy, could alternatively be implicated in the recruitment of Th2 cells to the site of implantation in order to protect the embryo and the placenta from an attack by the immune system, similar to what was shown in human pregnancy (Michimata *et al.* 2002). We have also showed a significant increase of PGE₂ metabolite on days 10, 12, and 14 of pregnancy (data not shown). Kennedy & Ross (1993) studies have clearly showed that PGE₂ is involved in decidualization and PGE₂ could also be involved in DB regression since it is significantly increased during this specific period of pregnancy. Recently, we have showed that transforming growth factor (TGF)- β isoforms are increased in the DB and induce apoptosis in decidual cells *in vitro*,

suggesting that TGF- β might be involved in DB regression (Shooner *et al.* 2005). TGF- β isoforms have been shown to increase PGE₂ secretion in several systems (Fong *et al.* 2000, Bradbury *et al.* 2002, Ishida *et al.* 2002, Chen *et al.* 2003). Whether TGF- β induces decidual cells apoptosis through the stimulation of PGE₂ remains to be elucidated.

Since both PGIS and PGDS are upregulated in the endometrium on different days of rat pregnancy and are not regulated during the estrous cycle, we wondered whether sex steroids might be involved in this process and whether embryonic factors are involved. To answer these questions, we used ovariectomized rats treated with sex steroids to induce pseudopregnancy. The results clearly showed that PGIS, as well as its metabolite, is upregulated in response to sex steroids and in a dose-dependent manner. PGDS protein was also increased albeit to a lesser level as compared with PGIS, but its metabolite was not influenced by pseudopregnancy as opposed to pregnancy. These results suggest that regulation of PGDS expression is dependent on the presence of an embryo, while regulation of PGIS expression is not dependent on embryonic factors and is directly regulated by sex steroids. The fact that both PGDS and PGIS were not influenced by sex steroids in the estrous cycle but their expression was affected during pregnancy and in the model of steroid-induced pseudopregnancy indicates that exposure time and steroid concentration is important to induce PGDS and PGIS expression. The concentration and/or exposure time to steroids during the estrous cycle is probably not sufficient to act on gene expression, indicating that these enzymes might play a negligible role in the non-pregnant endometrium.

In conclusion, this study is the first to characterize the expression of PGIS and PGDS in the non-pregnant, pregnant, and steroid-induced pseudopregnant uterus and shows that these two enzymes might be key factors involved in embryo implantation and DB regression. PGDS might also be an important enzyme to induce PGD₂ synthesis at the time of parturition. Whether these enzymes are directly or indirectly involved in the activation of luminal epithelial cell apoptosis during implantation and apoptosis activation during DB regression remains to be elucidated.

Acknowledgements

This work has been supported by a grant from NSERC (238501-01). Eric Asselin is holder of the Canada research chair in Molecular Gyneco-oncology. We are grateful to Mrs Rollande Caron for the contribution of her precious time and expertise to our projects. We also thank Mrs Daphne Efford and Dr Céline Van Themsche for reviewing the manuscript. The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

References

- Abrahamsohn PA & Zorn TM 1993 Implantation and decidualization in rodents. *J.Exp.Zool.* 266 603-628.
- Bazer FW 1975 Uterine protein secretions: Relationship to development of the conceptus. *J.Anim Sci.* 41 1376-1382.
- Bradbury DA, Newton R, Zhu YM, Stocks J, Corbett L, Holland ED, Pang LH & Knox AJ 2002 Effect of bradykinin, TGF-beta1, IL-1beta, and hypoxia on COX-2 expression in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 283 L717-L725.
- Burghardt RC, Johnson GA, Jaeger LA, Ka H, Garlow JE, Spencer TE & Bazer FW 2002 Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cells Tissues.Organs* 172 202-217.
- Chen KH, Hsu WM, Chiang CC & Li YS 2003 Transforming growth factor-beta2 inhibition of corneal endothelial proliferation mediated by prostaglandin. *Curr.Eye Res.* 26 363-370.
- Coleman RA, Grix SP, Head SA, Louttit JB, Mallett A & Sheldrick RL 1994 A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins* 47 151-168.
- Coleman RA, Kenendy I, Humphrey PPA, Bunce K & Lumley P 1990 Prostanoids and their receptors. In *Comprehensive Medicinal Chemistry. Membranes and Receptors*, pp 643-671. Ed JC Emmett. Oxford: Pergamon.
- Dai D & Ogle TF 1999 Progesterone regulation of epidermal growth factor receptor in rat decidua basalis during pregnancy. *Biol.Reprod.* 61 326-332.

Dery MC, Leblanc V, Shooner C & Asselin E 2003 Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17beta-estradiol in the rat uterus during estrous cycle. *Reprod.Biol.Endocrinol.* 1 47.

DeWitt DL & Meade EA 1993 Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of the prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isozymes. *Arch.Biochem.Biophys.* 306 94-102.

Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T & Wang H 2004 Molecular cues to implantation. *Endocr.Rev.* 25 341-373.

Enders AC 2000 Trophoblast-uterine interactions in the first days of implantation: models for the study of implantation events in the human. *Semin.Reprod.Med.* 18 255-263.

Enders AC & Schlafke S 1969 Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation. *Am.J.Anat.* 125 1-29.

Enders AC & Schlafke S 1971 Penetration of the uterine epithelium during implantation in the rabbit. *Am.J.Anat.* 132 219-230.

Enders AC, Schlafke S & Hendrickx AG 1986 Differentiation of the embryonic disc, amnion, and yolk sac in the rhesus monkey. *Am.J.Anat.* 177 161-185.

Evetts GE, Xie W, Chipman JG, Robertson DL & Simmons DL 1993 Prostaglandin G/H synthase isoenzyme 2 expression in fibroblasts: regulation by dexamethasone, mitogens, and oncogenes. *Arch.Biochem.Biophys.* 306 169-177.

Fazleabas AT, Kim JJ, Srinivasan S, Donnelly KM, Brudney A & Jaffe RC 1999 Implantation in the baboon: endometrial responses. *Semin.Reprod Endocrinol.* 17 257-265.

Fong CY, Pang L, Holland E & Knox AJ 2000 TGF-beta1 stimulates IL-8 release, COX-2 expression, and PGE(2) release in human airway smooth muscle cells. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 279 L201-L207.

Geisert RD & Yelich JV 1997 Regulation of conceptus development and attachment in pigs. *J.Reprod.Fertil.Suppl* 52 133-149.

Giannoulas D, Alfaidy N, Holloway AC, Gibb W, Sun M, Lye SJ & Challis JR 2002 Expression of prostaglandin I(2) synthase, but not prostaglandin E synthase, changes in myometrium of women at term pregnancy. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 87 5274-5282.

Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW & Spencer TE 2001 Developmental biology of uterine glands. *Biol.Reprod.* 65 1311-1323.

Hoffman LH, Olson GE, Carson DD & Chilton BS 1998 Progesterone and implanting blastocysts regulate Mucl expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinology* 139 266-271.

Ishida A, Fujita N, Kitazawa R & Tsuruo T 2002 Transforming growth factor-beta induces expression of receptor activator of NF-kappa B ligand in vascular endothelial cells derived from bone. *J.Biol.Chem.* 277 26217-26224.

Jabbour HN & Boddy SC 2003 Prostaglandin E2 induces proliferation of glandular epithelial cells of the human endometrium via extracellular regulated kinase 1/2-mediated pathway. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 88 4481-4487.

Kanaoka Y & Urade Y 2003 Hematopoietic prostaglandin D synthase. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 69 163-167.

Kennedy TG 1983 Embryonic signals and the initiation of blastocyst implantation. *Aust.J.Biol.Sci.* 36 531-543.

Kennedy TG 1994 Involvement of local mediators in blastocyst implantation. In Endocrinology of Embryo-Endometrium Interactions, pp 183-194. Eds SR Glasser, J Mulholland & A Psychoyos. New York: Plenum Press.

Kennedy TG & Ross HE 1993 Effect of prostaglandin E2 on rate of decidualization in rats. Prostaglandins 46 243-250.

Kirihara N, Naganawa A, Hori T, Kawakami E & Tsutsui T 2005 Influence of a PGF2alpha-analogue, etiproston tromethamine, on the functional *corpus luteum* of dogs. J.Vet.Med.Sci. 67 1-6.

Kothapalli D, Fuki I, Ali K, Stewart SA, Zhao L, Yahil R, Kwiatkowski D, Hawthorne EA, FitzGerald GA, Phillips MC, Lund-Katz S, Pure E, Rader DJ & Assoian RK 2004 Antimitogenic effects of HDL and APOE mediated by Cox-2-dependent IP activation. J.Clin.Invest 113 609-618.

Kothapalli D, Stewart SA, Smyth EM, Azonobi I, Pure E & Assoian RK 2003 Prostacyclin receptor activation inhibits proliferation of aortic smooth muscle cells by regulating cAMP response element-binding protein- and pocket protein-dependent cyclin a gene expression. Mol.Pharmacol. 64 249-258.

Kraemer SA, Meade EA & DeWitt DL 1992 Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. Arch.Biochem.Biophys. 293 391-400.

Kujubu DA & Herschman HR 1992 Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. J.Biol.Chem. 267 7991-7994.

Leblanc V, Dery MC, Shooner C & Asselin E 2003 Opposite regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat endometrium in response to 17beta-estradiol at estrus. Reprod.Biol.Endocrinol. 1 59.

Lim H & Dey SK 2002 A novel pathway of prostacyclin signaling-hanging out with nuclear receptors. *Endocrinology* 143 3207-3210.

Lim H, Gupta RA, Ma WG, Paria BC, Moller DE, Morrow JD, DuBois RN, Trzaskos JM & Dey SK 1999 Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev.* 13 1561-1574.

Martel D, Monier MN, Roche D & Psychoyos A 1989 Effect of mifepristone (RU 486) on concentrations of prostaglandin E-2 binding sites in the rat endometrium. *J.Reprod Fertil.* 85 527-532.

Michimata T, Tsuda H, Sakai M, Fujimura M, Nagata K, Nakamura M & Saito S 2002 Accumulation of CRTH2-positive T-helper 2 and T-cytotoxic 2 cells at implantation sites of human decidua in a prostaglandin D(2)-mediated manner. *Mol.Hum.Reprod.* 8 181-187.

Narumiya S, Sugimoto Y & Ushikubi F 1999 Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 79 1193-1226.

O'Neill GP & Ford-Hutchinson AW 1993 Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett.* 330 156-160.

Ogle TF & George P 1995 Regulation of the estrogen receptor in the decidua basalis of the pregnant rat. *Biol.Reprod.* 53 65-77.

Papay KD & Kennedy TG 2000 Characterization of temporal and cell-specific changes in transcripts for prostaglandin E(2) receptors in pseudopregnant rat endometrium. *Biol.Reprod* 62 1515-1525.

Rankin JC, Ledford BE, Jonsson HT, Jr. & Baggett B 1979 Prostaglandins, indomethacin and the decidual cell reaction in the mouse uterus. *Biol.Reprod.* 20 399-404.

Saito S, Tsuda H & Michimata T 2002 Prostaglandin D2 and reproduction. *Am.J.Reprod.Immunol.* 47 295-302.

Sadow BA, West NB, Norman RL & Brenner RM 1979 Hormonal control of apoptosis in hamster uterine luminal epithelium. *Am.J.Anat.* 156 15-35.

Shi JJ, Ma XH, Diao HL, Ni H, Xu LB, Zhu H & Yang ZM 2005 Differential expression of prostaglandin E receptor subtype EP2 in rat uterus during early pregnancy. *Histol.Histopathol.* 20 1021-1028.

Shooner C, Caron PL, Frechette-Frigon G, Leblanc V, Dery MC & Asselin E 2005 TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival. *Reprod.Biol.Endocrinol.* 3 20.

Simmons DL, Xie W, Chipman JG & Evett GE 1991 Prostaglandins, Leukotrienes, Lipoxins, and PAF. In pp 67-78. Ed JM Bailey. New York: Plenum Publishing Corp.

Smith MS, Freeman ME & Neill JD 1975 The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the *corpus luteum* of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96 219-226.

Tamura K, Hara T, Kutsukake M, Iwatsuki K, Yanagida M, Yoshie M & Kogo H 2004 Expression and the biological activities of insulin-like growth factor-binding protein related protein 1 in rat uterus during the periimplantation period. *Endocrinology* 145 5243-5251.

Tanabe T & Ullrich V 1995 Prostacyclin and thromboxane synthases. *J.Lipid Mediat.Cell Signal.* 12 243-255.

Urade Y & Eguchi N 2002 Lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases as a novel example of functional convergence. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69 375-382.

Williams CS & DuBois RN 1996 Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am.J.Physiol* 270 G393-G400.

Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL & Simmons DL 1991 Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88 2692-2696.

Yang ZM, Das SK, Wang J, Sugimoto Y, Ichikawa A & Dey SK 1997 Potential sites of prostaglandin actions in the periimplantation mouse uterus: differential expression and regulation of prostaglandin receptor genes. *Biol.Reprod* 56 368-379.

Zhang X, Shu MA, Ross HE & Kennedy TG 1996 Regulation of plasminogen activator in rat endometrial stromal cells: the role of prostaglandin E2. *Biol.Reprod.* 54 1046-1051.

Figure Legend

Figure 3.1: PGDS and PGIS expression in the female rat endometrium during estrous cycle. Total endometrial proteins were collected from polyoestrus cycling rats at each stage of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus). Western blots analysis of PGIS (A) and PGDS (B) (one representative blot). Histograms show densitometric analysis of PGIS and PGDS proteins normalized to β -actin (42 kDa), which was used as an internal control for protein loading. Data represent the mean \pm SEM of four independent experiments (four different rats).

Figure 3.2: PGIS expression in the female rat endometrium during pregnancy. Total endometrial proteins were collected at indicated days of pregnancy. Western blots analysis of PGIS during early and late pregnancy was performed (one representative blot presented). Histograms show densitometric analysis of PGIS protein normalized to β -actin (42 kDa), which was used as an internal control for protein loading. Data represent the mean \pm SEM of four independent experiments (four different rats). * $P < 0.05$ compared to day 6.5 (early pregnancy) and * $P < 0.05$ compared to days 8, 10, 18 and 20 (late pregnancy).

Figure 3.3: PGDS expression in the female rat endometrium during pregnancy. Total endometrial proteins were collected at indicated days of pregnancy. Western blots analysis of PGDS during early and late pregnancy was performed (one representative blot presented). Histograms show densitometric analysis of PGDS protein normalized to β -actin (42 kDa), which was used as an internal control for protein loading. Data represent the mean \pm SEM of four independent experiments (four different rats). * $P < 0.05$ compared to day 6.5 (early pregnancy) and * $P < 0.05$ compared to all other day (late pregnancy). # $P < 0.05$ compared to days 8 and 10.

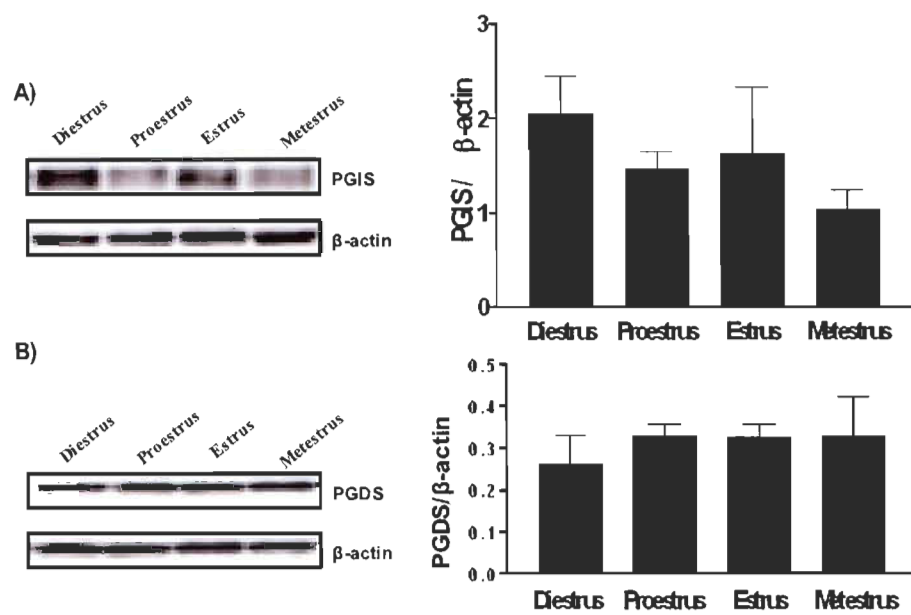
Figure 3.4: PGDS and PGIS expression in the female rat endometrium during the pseudopregnancy. Total endometrial proteins were collected at days 1, 3, 5, 7 and 9 of the induced pseudopregnancy. Western blots analysis of A) PGDS and B) PGIS (one

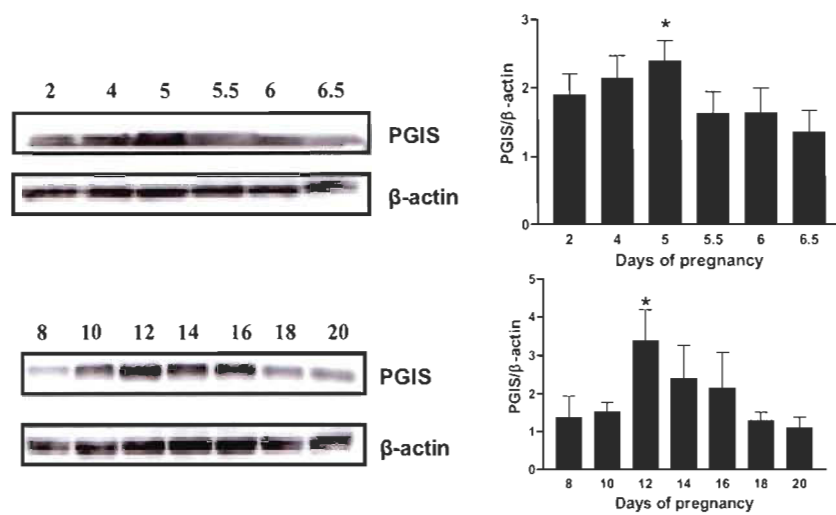
representative blot presented). Histograms show densitometric analysis of PGDS and PGIS protein normalized to β -actin (42 kDa), which was used as internal controls for protein loading. Data represent the mean \pm SEM of four independent experiments (four different rats). A) * $P < 0.05$ compared to days 1, 7 and 9. B) * $P < 0.05$ compared to days 1, 7 and 9.

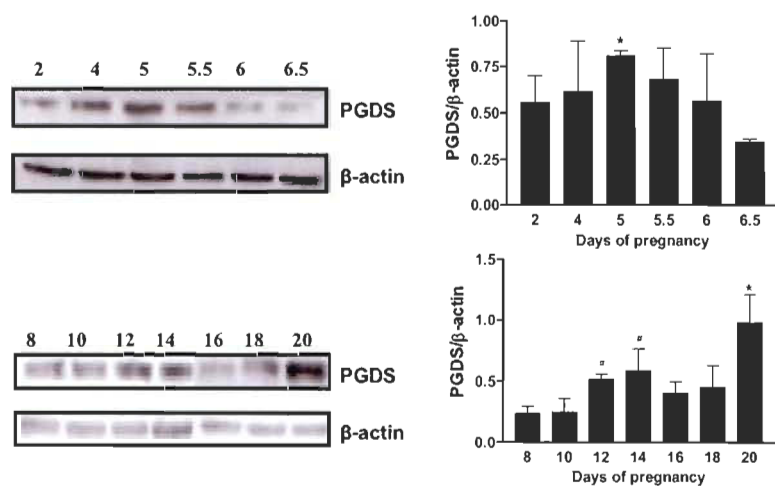
Figure 3.5: Immunohistochemical staining was performed to localize PGDS and PGIS proteins in the rat endometrium. PGDS and PGIS immunoreactivity was detected in the pregnant endometrium. They were both localized in the epithelial cells of endometrium and their expressions were absent in the stroma. A high level of PGDS immunostaining was observed in the luminal and glandular epithelium at days 14 (DB regression) and 20 (parturition) of pregnancy. A strong staining of PGIS immunostaining in the luminal epithelium at day 14 (DB regression) of pregnancy was observed. LE: luminal epithelium; GE: glandular epithelium; S: stroma.

Figure 3.6: PGD2 and PGI2 metabolites concentrations in serum were determined during the estrous cycle (A and B) and pregnancy (C and D) by enzyme immunoassay (EIA). Serum samples were collected from polyoestrus cycling rats at each stage of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus) or pregnant rats at indicated days of pregnancy and were measured using a high sensitivity enzyme immunoassay (EIA) kit obtained from Cayman Chemicals. Statistical significance was reached when $P < 0.05$; A and B) * indicates values different from all the others, while different letters indicate significant differences. C) * $P < 0.05$ compared to all other days. # $P < 0.05$ compared to day 5. D) * $P < 0.05$ compared to days 5 and 5.5.

Figure 3.7: A) PGD2 and B) PGI2 metabolites concentrations in serum were determined during pseudopregnancy by enzyme immunoassay (EIA). Serum samples were collected from pseudopregnant rats at indicated days of pregnancy and were measured using a high sensitivity enzyme immunoassay (EIA) kit obtained from Cayman Chemicals. A) * $P < 0.05$ compared to day 1. B) * $P < 0.05$ compared to days 1 and 9.

**FIGURE 3.1**

**FIGURE 3.2**

**FIGURE 3.3**

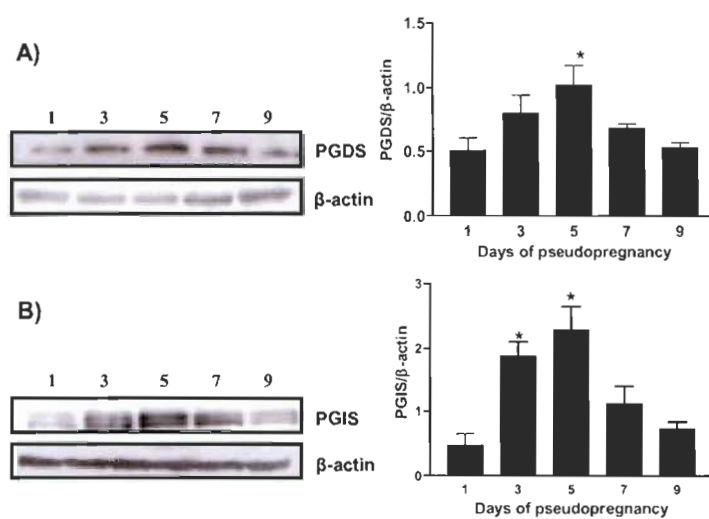


FIGURE 3.4

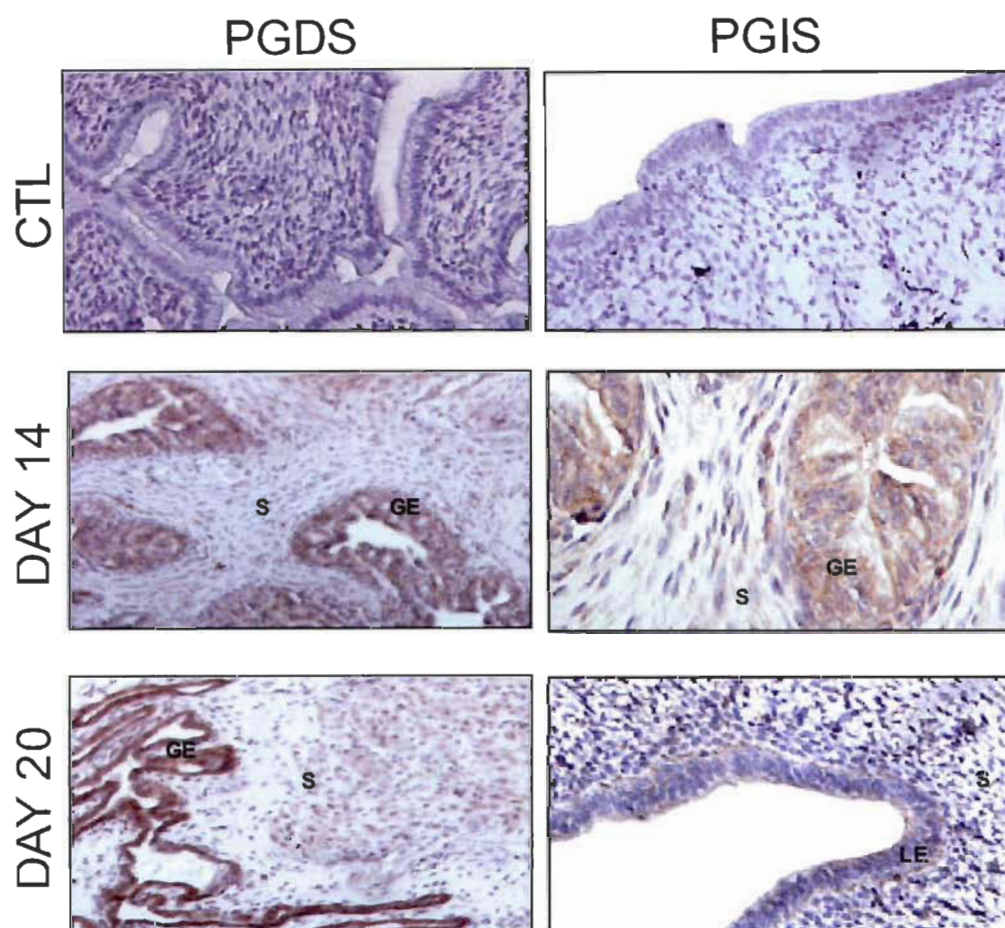


FIGURE 3.5

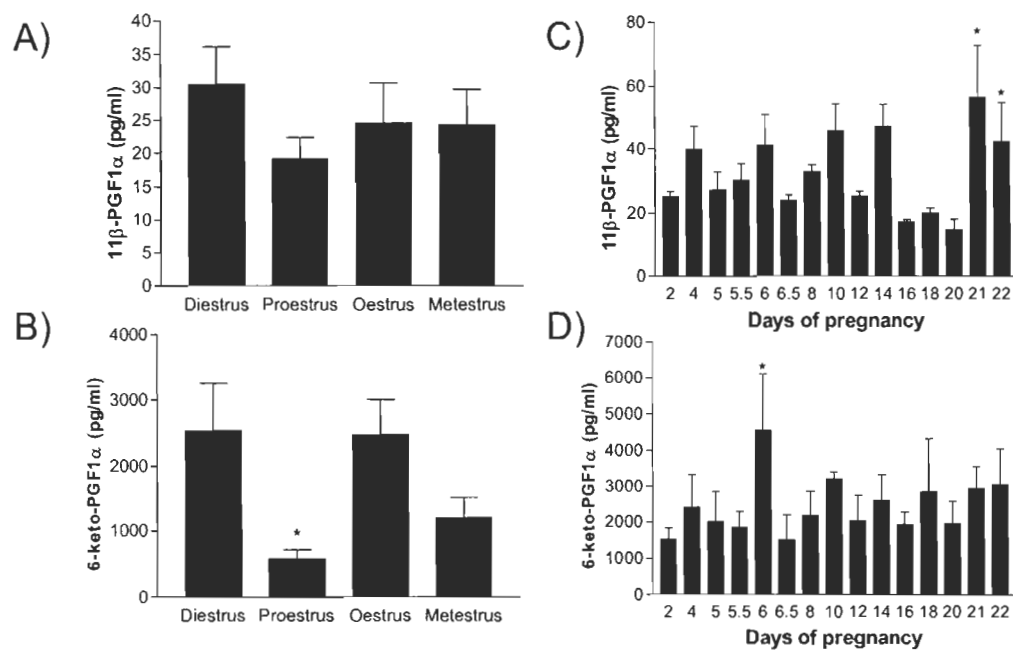
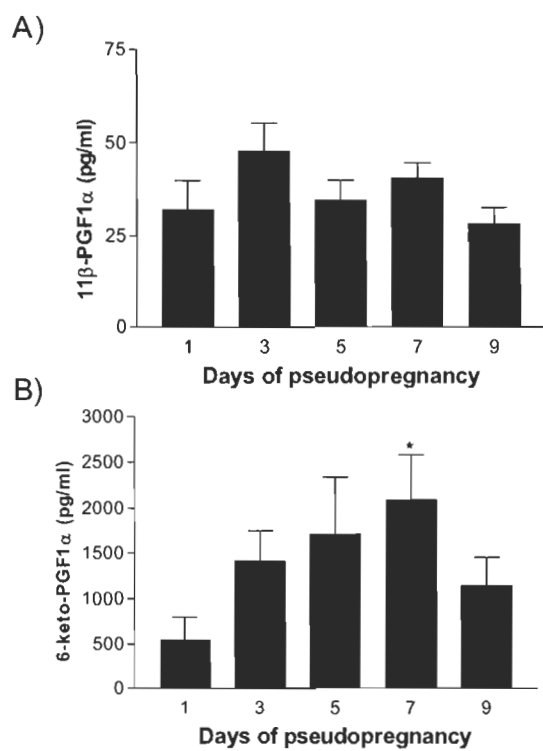


FIGURE 3.6

**FIGURE 3.7**

CHAPITRE 4

DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1 DISCUSSION

L'implantation est une étape critique de la gestation qui permet l'établissement de l'embryon au niveau du tissu utérin. La réussite de l'implantation est le résultat de plusieurs interactions entre l'embryon et le tissu utérin qui permettent l'invasion des trophoblastes au niveau du stroma. Plus d'une voie de signalisation cellulaire sont impliquées durant l'implantation dont certaines entraînent l'entrée en apoptose de cellules spécifiques. En effet, durant l'implantation, une augmentation de cette mort cellulaire a été détectée au niveau des cellules épithéliales de l'utérus aux sites d'implantation. Chez les rongeurs, l'implantation déclenche un processus de décidualisation où les cellules stromales se transforment en cellules déciduales. Vers le jour 14 de la gestation chez le rat, le nombre de ces cellules régresse, car ces dernières entrent également en apoptose.

Une partie de la présente étude porte sur les cyclooxygénases, car ces enzymes sont impliquées dans les fonctions reproductrices chez la femme. De plus, les COXs seraient impliquées dans l'invasion cellulaire et auraient un rôle dans le maintien de l'équilibre entre la mort et la survie cellulaire (Lim et al. 1997). L'hypothèse émise dans le cadre de cette étude était que les cyclooxygénases et les prostaglandines produites lors de la gestation sont des régulateurs importants de l'implantation et de la régression déciduale. Plus précisément, en considérant une possible implication de COX-2 dans l'invasion cellulaire et la prolifération, l'hypothèse émise était que COX-2 joue un rôle clé dans l'implantation et la régression déciduale durant la gestation chez la rate. Quant à leur régulation par les hormones stéroïdiennes, nous avons émis l'hypothèse que COX-2 est aussi régulé par les hormones stéroïdiennes tout comme COX-1, malgré le fait que certaines études aient évoqué une régulation différente de ces deux enzymes ainsi qu'une régulation de COX-2 principalement par le blastocyste qui s'implante.

Comme il a été mentionné précédemment dans ce document, l'étude de l'implantation au niveau de l'utérus et de l'embryon chez l'humain est impraticable. C'est pourquoi un modèle animal a été utilisé pour réaliser cette étude, c'est-à-dire le rat. Cet animal a été utilisé d'une part, parce que l'implantation est de type hémochoriale tout comme l'humain et d'autre part, car sa taille facilite les manipulations et la durée de gestation est rapide. De plus, notre laboratoire a développé une expertise concernant les fonctions reproductrices du rat au cours des dernières années. Ce modèle animal nous a permis entre autres de quantifier et localiser les cyclooxygénases dans le tissu utérin, d'observer leur régulation par l'œstrogène ainsi que la progestérone durant la gestation, la pseudogestation puis au cours du cycle oestral.

COX-1 est connu comme étant une enzyme constitutive et présente dans la majorité des types cellulaires. Cependant, nos résultats démontrent que l'expression de COX-1 au niveau de l'ARNm ainsi que de la protéine peut être régulée négativement dans l'endomètre de la rate. En effet, les résultats obtenus par PCR et par analyses Western Blot ont montré que l'expression de COX-1 était pratiquement indétectable à partir du jour 10 au jour 16 de la gestation, ce qui correspond à la régression déciduale. De plus, les résultats montrent que l'enzyme est régulée par l'estrogène et la progestérone durant la pseudogestation. Le niveau de COX-1 était élevé à des jours spécifiques de la pseudogestation et maximal au jour 5.

En analysant le profil d'expression de COX-1 durant la gestation et la pseudogestation, COX-1 semble jouer un rôle spécifique durant l'implantation et la décidualisation. Ces résultats coïncident avec ceux obtenus par Wang et Dey (Wang et al. 2005), qui suggéraient que les PGs générées par COX-1 étaient impliquées dans la décidualisation et permettaient de maintenir la perméabilité vasculaire endométriale durant la période suivant l'implantation (Wang et al. 2005). Nos résultats montrent également que COX-1 joue un rôle au cours de la parturition où le niveau de COX-1 est à son maximum dans l'endomètre utérin. Ce dernier résultat concorde avec ceux obtenus lors d'une étude réalisée par Reese et ses collaborateurs (Reese et al. 2000); laquelle tend à démontrer que COX-1 est une source majeure de prostaglandines durant la

parturition et que c'est une enzyme essentielle à la réussite de cette dernière étape de la gestation. Il est donc possible que l'augmentation de $\text{PGF2}\alpha$ et de PGD2 durant la parturition provienne de l'augmentation de COX-1 à cette même période. $\text{PGF2}\alpha$ est connu pour jouer un rôle primordial dans le myomètre utérin au cours de la parturition en augmentant les contractions induites par l'ocytocine.

Quant à COX-2, des études effectuées chez des souris tendent à démontrer que COX-2 est impliquée durant l'implantation et serait essentiel à sa réussite (Wang et al. 2005). Des études réalisées chez des souris ont démontré que l'absence de COX-2 entraîne des problèmes au niveau de l'ovulation et la fécondation, mais aussi lors l'implantation ainsi que lors de la décidualisation (Matsumoto et al. 2001). Au cours de la présente étude, une augmentation de COX-2 durant l'implantation et la décidualisation n'a pu être détectée. Cependant, les résultats obtenus montrent que COX-2 est induit en début de gestation, c'est-à-dire du jour 2 à 5 de la gestation chez la rate. De plus, COX-2 a été détecté par immunohistochimie dans les cellules épithéliales et stromales de l'utérus de la rate gestante. Il a également été détecté dans l'utérus de la rate pseudogestante et durant le cycle oestral. D'autres études ont démontré que COX-2 était présent dans les cellules épithéliales près du site d'implantation, lesquelles entrent en apoptose durant l'invasion du blastocyste (Wang et al. 2005; Chakraborty et al. 1996). Il est par conséquent possible que COX-2 soit exprimé en début de gestation dans le but de limiter la mort cellulaire des cellules épithéliales. Le gène de COX-2 a également été détecté au pôle antimésométrial, mais seulement autour du blastocyste au moment de la réaction d'attachement chez les souris (Wang et al. 2005).

Les résultats de cette étude révèlent que les deux cyclooxygénases sont présentes dans l'utérus de la rate en début de gestation. Puisque les deux enzymes sont présentes durant cette période, il est possible qu'elles participent à la production de PGs telles PGE2 , $\text{PGF2}\alpha$ et PGI2 . La présence et l'implication de PGE2 en début de gestation ont fait l'objet de plusieurs études réalisées entre autres par Kennedy et son équipe (Kennedy et al. 1993). La PGE2 jouerait un rôle clé dans le processus de décidualisation chez la rate en permettant l'augmentation de la perméabilité vasculaire. De plus, une

étude réalisée sur des souris déficientes en COX-2 (COX-2^{-/-}) a démontré que PGI₂ joue un rôle majeur dans l'implantation, et que PGE₂ joue un rôle complémentaire durant ce processus (Lim et al. 1999).

En analysant la quantité de métabolites de PGE₂ et PGF₂α durant la pseudogestation, une augmentation des deux métabolites a été observée au jour 7 et aussi au jour 9 pour le métabolite de PGE₂. En regardant l'expression de COX-2, il est possible de constater que son expression augmente du jour 3 à 9 de la pseudogestation. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de COX-2 serait responsable de l'augmentation de PGE₂ et PGF₂α durant cette même période. Les résultats obtenus lors de la pseudogestation coïncident avec ceux obtenus lors de la gestation où COX-2 augmente du jour 8 à 16, tandis que COX-1 est pratiquement absent durant cette période. Durant la gestation, une augmentation des métabolites a également été détectée du jour 10 à 14. Ces résultats montrent d'une part que COX-2 joue un rôle durant la régression déciduale en entraînant la production de PGE₂ et PGF₂α et, d'autre part, que COX-2 est régulé en partie par les hormones stéroïdiennes provenant de la mère et non entièrement par le blastocyste.

Au cours de la présente étude, des analyses RT-PCR ont permis d'observer les variations d'ARN messager de COX-1 au cours des différents stades du cycle oestral. Selon ces analyses, COX-1 est régulée négativement à l'estrus, mais aucune variation significative de la protéine n'a été observée. D'autre part, une hausse de l'ARNm de COX-1 a été observée à l'estrus chez la souris (Lee et al. 2005).

Par contre, les résultats obtenus par Lee et ses collaborateurs (Lee et al. 2005) montrent que l'ARNm de COX-2 augmentait durant cette même période chez la souris. Nos résultats montrent que chez le rat, l'expression de la protéine COX-2 est élevée à l'estrus. Il a été démontré que, durant la phase d'estrus, une augmentation de l'apoptose est observée (Lai et al. 2000; Sato et al. 1997). Cette observation montre un rôle de cet enzyme dans la régulation de la mort cellulaire dans l'endomètre de la rate. De plus, nos résultats montrent que COX-2 augmente durant la régression déciduale où l'apoptose est

fortement présente. D'autre part, cette observation indique que la hausse de la synthèse de PGF2 α durant la période d'ovulation découlerait de l'augmentation de COX-2 qui survient durant cette même période. Comme il a été mentionné précédemment, cette PG permet la rupture folliculaire qui mène à l'ovulation.

Quant aux variations de la concentration d'estrogène et de progestérone, ces deux hormones ovariennes augmentent à partir du diestrus jusqu'au proestrus, ce qui coïncide avec la régulation de COX-2. De plus, COX-2 varie durant la pseudogestation chez la rate suite aux injections d'estrogène et de progestérone. Une variation de COX-1 a également été observée dans l'utérus de la rate pseudogestante. Les résultats obtenus au cours de cette étude, tant pour COX-1 et COX-2, suggèrent donc une régulation par l'estrogène et la progestérone au niveau de l'endomètre utérin.

Les prostaglandines PGF2 α et PGE2, qui sont principalement produites par l'endomètre, ont toutes deux fait l'objet de plusieurs études afin de déterminer leur rôle au niveau du système reproducteur de la femme notamment durant le cycle menstruel. En effet, des études ont démontré l'implication de PGF2 α dans la rupture folliculaire au moment de l'ovulation (Motta et al. 1994) et son rôle au niveau de la régression lutéale (Diaz et al. 2005; Tanaka et al. 2004). La concentration de PGF2 α augmente vers la fin de la phase lutéale et a un effet lutéolytique (Vijayakumar et al. 1983). Au cours de cette étude, une augmentation du métabolite de PGF2 α a été mesurée durant le proestrus et le métestrus et, pour le métabolite de PGE2, une hausse a été décelée durant la phase proestrus. Des études récentes ont démontré un rôle de PGE2 dans la prolifération des cellules épithéliales de l'endomètre utérin chez l'humain (Jabbour et al. 2003). L'augmentation du métabolite de PGE2 durant le proestrus suggère donc l'implication de cette PG dans la prolifération cellulaire dans l'utérus de la rate.

Des études réalisées par Kennedy et al. (Kennedy et al. 1993) ont démontré que PGE2 est impliquée dans le processus de décidualisation où les cellules stromales prolifèrent et se transforment en cellules déciduales. Les résultats de cette étude montrent que cette PG est impliquée non seulement dans la formation du tissu décidual,

mais aussi dans la régression de la *décidua basalis* chez la rate. En effet, une augmentation du métabolite de PGE2 aux jours 10, 12 et 14 de la gestation a été observée. Comme il a été mentionné plus haut, les résultats de cette étude semblent indiquer que COX-2 joue un rôle dans la régulation de l'apoptose durant cette période. Il est possible que la limitation de l'apoptose au niveau des cellules déciduales implique la production de cette prostaglandine.

Une étude réalisée par notre laboratoire a démontré que les trois isoformes du TGF- β augmentent durant la régression déciduale chez la rate et participeraient au déclenchement du processus apoptotique durant cette période de la gestation (Shooner et al. 2005). En effet, les résultats obtenus dans le cadre de cette étude ont montré que TGF- β induit l'apoptose au niveau des cellules déciduales *in vitro*, ce qui suggère leur implication dans la régression déciduale chez la rate (Shooner et al. 2005). Une étude réalisée sur des cellules intestinales (Mv1Lu) suggère un rôle du TGF- β dans l'induction de la synthèse de COX-2 et PGE2 (Saha et al. 1999).

Au cours de mes recherches, j'ai également participé à une étude portant sur la régulation de PGDS et PGIS lors de la gestation, de la pseudogestation et durant le cycle oestral (voir chapitre 3). L'objectif était de caractériser l'expression de ces enzymes dans l'utérus de la rate. Ces deux enzymes permettent la synthèse de PGD2 et de PGI2. L'hypothèse était que ces deux prostaglandines seraient impliquées à des étapes précises de la gestation et que leur synthèse est régulée par les hormones stéroïdiennes.

Les résultats des analyses immunohistochimiques ont révélé la présence de ces deux enzymes dans l'endomètre de la rate gestante, pseudogestante et durant le cycle oestral. Tout comme COX-1 et COX-2, ces deux enzymes se situent principalement au niveau des cellules épithéliales de l'endomètre de la rate. Il semble donc que la synthèse des prostaglandines se fait en grande partie dans cette région de l'endomètre.

Les analyses effectuées sur les utérus de rates aux différents stades du cycle oestral n'ont pas révélé de variation significative des niveaux de PGDS et PGIS au sein de l'endomètre. Les deux enzymes étaient présentes tout au long du cycle oestral à un

niveau élevé. La présence constante de ces deux enzymes suggère que PGD2 et PGI2 jouent des rôles importants au niveau des fonctions utérines chez la rate. Les niveaux des métabolites respectifs de PGD2 et PGI2 ont été dosés dans le sérum de rates afin de poursuivre l'investigation. Le niveau du métabolite de PGI2 n'était pas constant au cours des différents stades du cycle et une baisse significative a été observée lors du proestrus. Comme il a été discuté précédemment, une hausse du métabolite de PGE2 avait été observée durant le proestrus. Il semble donc que contrairement à PGE2, la PGI2 ne serait pas impliquée dans la prolifération cellulaire de l'endomètre durant le cycle oestral. Quant à la quantité de métabolite de PGD2, aucune variation significative n'a été observée.

Les résultats obtenus à partir des utérus de rate gestantes montrent au contraire une variation des deux enzymes à des stades précis de la gestation. Il a été remarqué que l'expression de PGDS était significativement élevée au jour 5 de la gestation. Cette augmentation tend à démontrer une hausse de la production de PGD2 en début de gestation et plus particulièrement lors de la période de l'implantation embryonnaire. Il est possible que cette PG joue un rôle dans la réussite de l'implantation chez la rate.

Une hausse de la PGDS a également été observée aux jours 12 et 14 de la gestation, ce qui coïncide avec la période de régression déciduale. Cette observation indique une hausse de la synthèse de PGD2 durant cette période, ce qui peut signifier la participation de cette PG lors de la régression de la décidue. Puisque l'expression de COX-1 est pratiquement nulle à ce stade, la synthèse de PGD2 se ferait via la transformation de l'acide arachidonique en PGH2 par COX-2. Suite au jour 14, l'expression de la PGDS diminue pour finalement augmenter de nouveau au jour 20 en fin de gestation. Le dosage du métabolite de PGD2 dans le sérum de la rate gestante révèle une forte augmentation de ce métabolite aux jours 21 et 22. Ces résultats semblent indiquer que PGD2 pourrait également participer au processus de la parturition tout comme PGF2 α . Puisque la protéine COX-1 est présente en grande quantité durant la parturition, il est possible que la synthèse de PGD2 se fait via COX-1.

Afin de déterminer le rôle exact de la PGD2 aux différentes étapes de la gestation, des études supplémentaires devront être réalisées ultérieurement. Jusqu'à présent, peu d'information existe concernant l'implication de cette PG au cours de la gestation.

Quant à PGIS, une hausse de cette protéine a été décelée au jour 6 de la gestation de même qu'une augmentation du métabolite de PGI2, ce qui démontre un rôle de PGI2 durant le processus d'implantation et de décidualisation où une augmentation de la perméabilité vasculaire se produit. Certaines études ont suggéré un rôle de cette PG durant la période d'implantation embryonnaire. En effet, PGI2, dérivant de COX-2, serait la première prostaglandine au site d'implantation (Matsumoto et al. 2001) et serait essentielle à la réussite de l'implantation chez la souris (Lim et al. 1997). Puisque PGI2 possède des propriétés vasodilatatrices, il est fort probable que cette PG participe à l'augmentation de la perméabilité vasculaire à ce moment. Cependant, comme il a été mentionné précédemment, une augmentation de l'expression de COX-2 n'a pu être décelée par Western Blot (voir chapitre 2). Donc, la présente étude ne permet d'affirmer si la PGI2 produit au moment de l'implantation et de décidualisation provient d'une augmentation de la synthèse de son précurseur via COX-2 ou COX-1.

Les résultats obtenus lors de cette étude indiquent également une augmentation de l'enzyme PGIS au jour 12 de la gestation. Cette observation peut signifier que l'augmentation de COX-2 durant la régression déciduale entraîne une hausse générale de la synthèse des PGs. En effet, une augmentation des métabolites de PGE2 et PGF2 α avaient été observés de même qu'une augmentation de la PGDS. Il est donc possible que les PGs jouent un rôle primordial lors du processus d'apoptose au niveau de la décidue qui est caractéristique de cette période de la gestation. Suite au jour 12, la PGIS diminue graduellement au sein de l'endomètre de la rate gestante. La PGI2 est cependant présente dans le myomètre de l'utérus et permet la relâche du segment utérin lors de la parturition.

Quant à la pseudogestation, les résultats des analyses Western Blot montrent un profil d'expression semblable pour la PGIS et la PGDS. Les analyses Western Blot

effectuées montrent une expression maximale de PGIS et PGDS au jour 5 de la pseudogestation, mais une augmentation moins prononcée pour PGDS. Une augmentation marquée du métabolite de PGI2 a été observée du jour 1 à 7 et le niveau maximal de la protéine a été détecté au jour 5. Ces résultats montrent que la synthèse de PGI2 est régulée à la hausse en réponse aux traitements d'œstrogène et de progestérone. Quant à la synthèse de PGD2, malgré le fait qu'une augmentation de la PGDS ait été observée lors de la pseudogestation, une variation significative du métabolite de PGD2 n'a pas été observée. Lors de la gestation, des variations significatives de cet enzyme avaient été observées à des stades précis dont entre autres au moment de la l'implantation embryonnaire. Ces résultats suggèrent que la synthèse de PGD2 à ce moment précis, dépend de la présence de l'embryon qui s'implante et ne serait pas modulée par les hormones stéroïdiennes maternelles. Le fait que PGDS et PGIS n'ont pas été influencées durant le cycle oestral où se produit des variations d'œstrogène et de progestérone peut signifier que la concentration de ces deux hormones est un facteur important dans la modulation des deux enzymes. Une autre hypothèse que les prostaglandines PGD2 ainsi que PGI2 ne sont pas essentielles lors du cycle oestral contrairement à PGF2 α qui est impliquée au moment de l'ovulation.

4.2 CONCLUSION

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude ont permis de caractériser l'expression de COX-1 et aussi de COX-2 dans l'utérus de la rate gestante, pseudogestante et durant le cycle oestral. Ces résultats démontrent que ces deux enzymes sont des régulateurs clés impliqués aux différentes étapes de la gestation.

La première hypothèse émise concernait la possible implication de COX-2 durant l'implantation et la régression déciduale chez la rate gestante. Les résultats obtenus ont révélé que COX-2 était induit en début de gestation et augmentait durant la régression déciduale où l'apoptose est présente, ce qui tend à confirmer un rôle de COX-2 dans le contrôle de l'apoptose. Cette augmentation durant la régression déciduale coïncide avec une forte production de PGE2 et PGF2 α .

Des études précédentes ont évoqué une régulation différente de COX-1 et COX-2 durant l'implantation chez les rates. Les résultats obtenus montrent que les deux enzymes sont régulés par l'œstrogène et la progestérone, mais de façon différente. Selon les résultats obtenus lors de la pseudogestation, il semble que COX-2 soit régulé par les hormones stéroïdiennes au cours de la gestation et non pas seulement par le blastocyste qui s'implante (Chakraborty et al. 1996). L'expression de COX-2 varie également durant le cycle oestral et est élevée lors de l'oestrus, où il y a une forte présence de mort cellulaire au niveau des cellules épithéliales.

L'analyse de l'expression de COX-1 semble indiquer que cet enzyme joue un rôle spécifique durant l'implantation embryonnaire, la décidualisation et la parturition dans l'endomètre utérin de la rate. Son expression est modulée durant la gestation. En effet, COX-1 est pratiquement indétectable lors de la régression déciduale, mais fortement exprimé lors de la parturition. COX-1 serait donc responsable en majorité de la production de PGs, telle PGF2 α , PGD2 et PGD2 lors de la parturition chez la rate.

Une partie de cette étude avait pour but de caractériser l'expression des enzymes PGDS et PGIS dans l'utérus de la rate gestante, pseudogestante et durant le cycle oestral. Les résultats obtenus montrent que ces enzymes sont impliquées dans le processus de l'implantation embryonnaire et aussi lors de la régression déciduale. L'augmentation marquée de PGDS au moment de la parturition indique également son implication et plus précisément celle de PGD2 au moment de la parturition chez la rate.

En ce qui a trait aux rôles respectifs de PGE2, PGF2, PGD2 et PGI2 ainsi que des cyclooxygénases dans le processus d'apoptose présent lors de l'implantation embryonnaire, la régression déciduale et aussi lors de l'oestrus (cycle oestral), des études supplémentaires devront être réalisées afin de les déterminer.

En résumé, la principale conclusion de la présente étude est que les cyclooxygénases et les prostaglandines produites lors de la gestation sont des régulateurs importants impliqués dans l'implantation embryonnaire, la décidualisation, la régression déciduale et la parturition.

Les études comme celle-ci sont importantes afin d'améliorer la compréhension des différents phénomènes physiologiques et cellulaires qui se produisent au niveau de l'utérus de la femme durant la gestation. Les résultats obtenus au cours de cette étude ont permis de contribuer à une meilleure compréhension du rôle respectif des différentes prostaglandines et des cyclooxygénases au sein de l'endomètre et plus particulièrement de leur implication au cours de la gestation. La compréhension des différents rôles des prostaglandines permettra un jour de mettre au point des traitements adéquats afin de corriger l'infertilité féminine, d'accroître la fertilité ou encore d'améliorer les moyens de contraception existants.

4.3 PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Afin de poursuivre dans cette voie, il serait intéressant de vérifier l'expression de COX-2 au niveau de son ARNm durant la gestation, la pseudogestation et le cycle oestral chez la rate. De plus, il serait pertinent de vérifier l'expression de l'ARNm des prostaglandines ainsi que de leur transporteur afin d'approfondir cette étude. Ces analyses supplémentaires permettraient de mieux comprendre les différents mécanismes impliqués et d'avoir une vue d'ensemble sur l'implication des PGs durant la gestation.

BIBLIOGRAPHIE

Able, M. H. Kelly, R. W. (1979) "Differential production of prostaglandins within the human uterus" *Prostaglandins*. Nov; 18(5):821-8.

Abrahamsohn PA, Zorn TM (1993) "Implantation and decidualization in rodents" *J Exp Zool*, 266:603-628.

Abramovitz, M., Adam, M., Boie, Y., Carrière, M., Denis, D., Godbout, C., Lamontagne, S., Rochette, C., Sawyer, N., Tremblay, N. M., Belley, M., Gallant, M., Dufresne, C., Gareau, Y., Ruel, R., Juteau, H., Labelle, M., Ouimet, N., Metters, K. M. (2000) "The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs" *Biochim Biophys Acta* Jan 17; 1483(2):285-93.

Akali K.C., Khan S.A., Moulton B.C. (1996) "Effect of décidualisation on the expression of bax and bcl-2 in the rat uterine endometrium." *Endocrinology* 137:3123-3131.

Boshier, D. P., Moriarty, K. M. (1970) "Some effects on the conceptus of prior immunological sensitization of ewes to the sire" *J Reprod Fertil*. Apr; 21(3):495-500.

Brown J.M. and Attardi L.D. (2005) "The role of apoptosis in cancer development and treatment response." *Nature Reviews* Volume 5: 231-237.

Campbell.N.A. (1995) "Biologie", Édition du Renouveau Pédagogique Inc., St-Laurent, Québec, Canada, pp. 937-945.

Chakraborty, I., Das, S. K., Wang, J., Dey, S. K. (1996) "Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids" *J. Mol. Endocrinol.* 16: 107-22.

Challis, J.R.G., Sloboda, D., Alfaidy, N., Lye, S.J., Gibb, W., Patel, F.A., Whittle, W.L., Newnham, J.P. (2002) "Prostaglandins and mechanisms of preterm birth", *Reproduction* 124 :1-17.

Dai D., Moulton B.C., Ogle T.F. (2000) "Regression of the decidualized mesometrium and decidual cell apoptosis are associated with a shift in expression of Bcl2 family members." *Biol Reproduction* 63:188-195.

Dennefors, B., Hamberger, L., Hillensjö, T., Holmes, P., Janson, P. O., Magnusson, C., Nilsson, L. (1983) "Aspects concerning the role of prostaglandins for ovarian function" *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl.*; 113:31-41.

Dery, M. C., Leblanc, V., Shooner, C., Asselin, E. (2003) "Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17 β -estradiol in the rat uterus during estrous cycle", *Reprod Biol Endocrinol.* Jun 12; 1:47.

Diaz, F. J., Wiltbank, M. C. (2005) "Acquisition of luteolytic capacity involves differential regulation by prostaglandin F $_{2\alpha}$ of genes involved in progesterone biosynthesis in the porcine corpus luteum" *Domest. Anim Endocrinol.* 28(2):172-189.

Drummond, A. E., (2006) "The role of steroids in follicular growth" *Reproductive Biology and Endocrinology* 4:16-27.

Enders A. C. (2000) "Trophoblast-uterine interactions in the first days of implantation: models for the study of implantation events in the human" *Semin Reprod Med*, 18:255-263.

Enders AC, Schlafke S. (1969) "Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation" *Am J Anat*, 125:1-29.

Enders AC, Schlafke S. (1971) "Penetration of the uterine epithelium during implantation in the rabbit" *Am J Anat*, 132:219-230.

Enders AC, Schlafke S. (1972) "Implantation in the ferret: epithelial penetration" *Am J Anat.*, Mar; 133(3):291-315.

Fazleabas A.T., Strakova Z. (2002) "Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment" *Molecular and cellular endocrinology* 186: 143-147.

Fetalvero KM, Zhang P, Shyu M, Young BT, Hwa J, Young RC, Martin KA. (2008) "Prostacyclin primes pregnant human myometrium for an enhanced contractile response in parturition." *The Journal of Clinical Investigation*, Dec; 118(12): 3966-79.

Goldman, S., Weiss, A., Almalah, I., Shalev, E. (2005) "Progesterone receptor expression in human decidua and fetal membranes before and after contractions: possible mechanism for functional progesterone withdrawal" *Mol. Hum. Reprod.* 11:296-277.

Gu, Y., Jow, G. M., Moulton, B. C., Lee, C., Sensibar, J. A., Park-Sarge, O. K., Chen, T. J., Gibori, G. (1994) "Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization" *Endocrinology* Sep; 135(3):1272-9.

Gyomerey, S., Lye, S. J., Gibb, W., Challis, J. R. (2000) "Fetal-to-maternal progression of prostaglandin H $_2$ synthase-2 expression in ovine intrauterine tissues during the course of labor" *Biol Reprod.* Mar; 62(3):797-805.

Hagström H-G., Hahlin M., Bennegard-Edén B., Bourne T., Hamberger L. (1996) "Regulation of corpus luteum function in early human pregnancy." *Fertility and Sterility* Vol. 65. No 1, January.

Hata, A. N. and R. M. Breyer. (2004) "Pharmacology and signalling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation" *Pharmacol. Ther.* 103: 147-66.

Hla, T., Bishop-Bailey, D., Liu, C. H., Schaeffers, H. J., Trifan, O. C. (1999) "Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes" *Int. J. Biochem.Cell Biol.* 31:551-57.

Holmes PV., Sjögren A., Hamberger L. (1990) "Prostaglandin-E2 released by pre-implantation human conceptuses." *J Reprod Immunol* 17:79-86.

Huet-Hudson YM, Andrews GK, Dey SK. (1989) "Links Cell type-specific localization of c-myc protein in the mouse uterus: modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period" *Endocrinology*, Sep;125(3):1683-90.

Humphrey, K.W. (1969) "Induction of implantation of blastocysts transferred to ovariectomized mice" *J.Endocrinol* 44: 299-305.

Jabbour, H. N., Boddy, S. C. (2003) "Prostaglandin E2 induces proliferation of glandular epithelial cells of the human endometrium via extracellular regulated kinase 1/2-mediated pathway" *J Clin Endocrinol Metab* 88:4481-4487.

Jensen, D. V., Andersen, K. B., Wagner, G. (1987) "Prostaglandins in the menstrual cycle of women" *Dan Med Bull.* Jun; 34(3):178-82.

Joswig, A., H Gabriel, H-D., Kibschull, M., Winterhager, E. (2003) "Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways" *Reproductive Biology and Endocrinology* 1:44:1-9.

Kamei T, Jones SR, Chapman BM, MCGonigle KL, Dai G, Soares MJ (2002) "The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway modulates the endocrine differentiation of trophoblast cells" *Mol Endocrinol* Jul; 16(7):1469-81.

Kanaoka Y., Urade Y. (2003) "Hematopoietic prostaglandin D synthase" *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 69: 163-167.

Katsuyama, M., Sugimoto, Y., Morimoto, K., Hasumoto, K., Fukumoto, M., Negishi, M., Ichikawa, A (1997) "'Distinct cellular localization' of the messenger ribonucleic acid for prostaglandin E receptor subtypes in the mouse uterus during pseudopregnancy" *Endocrinology* Jan; 138(1):344-50.

Kelly, R. W., Lumsden, M. A., Abel, M. H., Baird, D. T. (1984) "The relationship between menstrual blood loss and prostaglandin production in the human: evidence for

increased availability of arachidonic acid in women suffering from menorrhagia" *Prostaglandins Leukot Med.* Oct; 16(1):69-78.

Kengni, J. H., St-Louis, I., Parent, S., Leblanc, V., Shooner, C., Asselin, E. (2007) "Regulation of prostaglandin D synthase and prostacyclin synthase in the endometrium of cyclic, pregnant, and pseudopregnant rats and their regulation by sex steroids" *J Endocrinol.* Nov; 195(2):301-11.

Kennedy, T. G. (1980) "Prostaglandins and the endometrial vascular permeability changes preceding blastocyst implantation and decidualization" *Prog.Reprod.Biol.* 7: 234-43.

Kennedy, T. G. (1983) "Embryonic signals and the initiation of blastocyst implantation", *Aust J Biol Sci*, 36:531-543.

Kennedy, T. G. (1985) "Evidences for the involvement of prostaglandins throughout the decidual cell reaction in the rat" *Biol Reprod* 33:140–146.

Kennedy, T. G., Ross, H. E. (1993) "Effect of prostaglandin E2 on rate of decidualization in rats" *Prostaglandins* 46:243-250.

Keys, J. L., King, G. J., Kennedy, T. G. (1986) "Increased uterine vascular permeability at the time of embryonic attachment in the pig" *Biol Reprod.* Mar; 34(2):405-11.

Lai, M. D., Lee, L. R., Cheng, K. S., Wing, L. Y., (2000) "Expression of proliferating cell nuclear antigen in luminal epithelium during the growth and regression of rat uterus" *Endocrinol* 166:87-93.

Lee, D. S., Yanagimoto Ueta, Y., Xuan, X, Igarashi, I., Fujisaki, K., Sugimoto, C., Toyoda, Y., Suzuki, H. (2005) "Expression patterns of the implantation-associated Genes in the uterus during the estrous cycle in mice" *J. Reprod. Dev.* 51:787-798.

Levasseur MC, Thibault C., (2001) "La reproduction chez les mammifères et l'homme", 2e Édition, Ellipses Edition Marketing SA, Paris, France.

Lim, H., Gupta, R. A., Ma, W. G., (1999) "Cyclo-oxygenase-2-derived prostacycline mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta" *Genes Dev* 13:1561-74.

Lim, H., Paria, B. C., Das, S. K., Dinchuk, J. E., Langenbach, R., Trzaskos, J. M., Dey, S. K. (1997) "Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase-2 deficient mice" *Cell* 91: 197-208.

Loke Y.W., King A., Burrows T.D. (1995) "Decidua in human implantation" *Human Reproduction* Volume 10 Supplement 2, p. 14-21.

- Luisi S., Florio P. Reis F.M. and Petraglia F. (2005) "Inhibins in female and male reproductive physiology: role in gametogenesis, conception, implantation and early pregnancy" *Human Reproduction Update* 11(2):123-135.
- Malassiné, A., Tarrade, A., Guibourdenche, J., Rochette-Égly, C., Évain-Brion, D. (2000) "Le Placenta" *Médecine/sciences*, 16: 329-35.
- Matsumoto, H., Wen-ge, M., Smalley, W., Trzaskos, J., Breyer, R. M. (2001) "Diversification of cyclooxygenase-2-derived prostaglandins in ovulation and implantation" *Biology of Reproduction* 64:1557-1565.
- Mayer G, Nilsson O, Reinius S. (1967) "Cell membrane changes of uterine epithelium and trophoblasts during blastocyst attachment in rat", *Z Anat Entwicklungsgesch.*, 126(1):43-8.
- Michimata T., Tsuda H., Sakai M., Fujimura M., Nagata K., Nakamura M and Saito S. (2002) "Accumulation of CRTH2-positive T-helper 2 and T-cytotoxic 2 cells at implantation sites of human deciduas in a prostaglandin D₂-mediated manner" *Molecular Human Reproduction* Vol.8, No.2: 181-187.
- Miyamoto, T., Ogino, N., Yamamoto, S., Hayaishi, O. (1976) "Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes" *J Biol Chem.* May 10; 251(9):2629-36.
- Mor G. et Abrahams V.M. (2003) "Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy" *Reprod Biol Endocrinol.* ; 1: 119.
- Motta, A. B, Franchi, A. M., Gimeno, A. L., Gimeno, M. A. (1994) "Influences of oxytocin on the synthesis of prostaglandins by uterus from rats in different stages of the estrous cycle" *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* Aug; 51(2):133-9.
- Mulac-Jericevic, B., Lydon, J. P., De Mayo, F. J., Conneely, O. M. (2003) "Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform" *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283:E1167-E1172.
- Mulac-Jericevic, B., Mullinax, R. A., De Mayo, F. J., Conneely, O. M. (2000) "Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor B isoform" *Science* 289:1751-1754.
- Nagata, K. (2003) "The second PGD2 receptor CRTH2: structure, properties, and functions in leukocytes" *Prostaglandins Leukotrienes and essential Fatty Acids* 69:169-177.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., & Ushikubi, F. (1999) "Prostanoid receptors: structures, properties, and functions", *Physiol. Rev.* 79, 1193-1226.

- Neil, K. (1994) "The physiology of Reproduction", 2e éd., Raven Press, New York, U.S.A., pp.391-421.
- Niswender GD., Wiltbank MC., Diskin MG. (1991) "Differential actions of second messenger systems in the corpus luteum." J Reprod Fertil 43 Suppl:65-75.
- Okada, H., Mak, T. W. (2004) "Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells" Nature Reviews 4:592-603.
- Olson, D. M. (2003) "The role of prostaglandins in the initiation of parturition" Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. Oct; 17(5):717-30.
- Pampfer, S., Donnay I. (1999) "Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat", Cell Death and Differentiation 6:533-545.
- Paria BC, Lim H, Das SK, Reese J, Dey SK. (2000) "Molecular signaling in uterine receptivity for implantation", Semin Cell Dev Biol. , Apr;11(2):67-76. Review.
- Paria BC, Song H, Dey SK. (2001) "Implantation: molecular basis of embryo-uterine dialogue", Int J Dev Biol., 45(3):597-605. Review
- Paria BC, Wang H, Dey SK. (2002) "Endocannabinoid signaling in synchronizing embryo development and uterine receptivity for implantation", Chem Phys Lipids, Dec 31;121(1-2):201-10.
- Parr, EL, Tung, HN, Parr, MB. (1987) "Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats." Biol Reprod. Feb; 36(1):211-25.
- Poyser, N. L. (1995) "The Control of Prostaglandin Production by the Endometrium in relation to Luteolysis and Menstruation", Prostaglandins Leukotrienes and essential Fatty Acids, 53:147-195.
- Pr Thierry Roger, Anatomie Comparée des Animaux de Laboratoire, http://www2.vet-lyon.fr/ens/expa/cours/anatcomparee/anatcomp_reinsgenit.htm
- Psychoyos, A., (1960) "The decidual reaction is preceded by early changes in the capillary permeability of the uterus" C R Seances Soc Biol Fil.;154:1384-7.
- Rees, M. C. P., Anderson, A. B., Demers, L. M., Turnbull, A. C. (1984) "Endometrial and myometrial prostaglandin release during the menstrual cycle in relation to menstrual blood loss" J Clin Endocrinol Metab. May; 58(5):813-8.
- Reese, J., Paria, B.C., Brown, N., Zhao, X., Morrow, J.D., Dey, S.K. (2000) "Coordinated regulation of fetal and maternal prostaglandins directs successful birth and postnatal adaptation in the mouse" Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 97.17: 9759-64.

- Reinius S. (1967) "Ultrastructure of blastocyst attachment in the mouse" *Z Zellforsch Mikrosk Anat.*, 77(2):257-66.
- Riley, J. K., Carayannopoulos, M. O., Wyman, A. H., Chi, M., Ratajczak, C. K., Moley, K. H. (2005) "The PI3K/Akt pathway is present and functional in the preimplantation mouse embryo" *Dev Biol.* Aug 15; 284(2):377-86.
- Rogers P. A. W. (1996) "Structure and function of endometrial blood vessels" *Human Reproduction Update*, Vol. 2, No. 1 : 57–62.
- Rugh,R. (1994) "Normal development of the mouse. In the mouse: its reproduction and development", Oxford University Press, Oxford, pp. 7-43.
- Saha, D., Datta, P. K., Sheng, H., Morrow, J. D., Wada, M., Moses, H. L., Beauchamp, R. D. (1999) "Synergistic induction of cyclooxygenase-2 by transforming growth factor-beta1 and epidermal growth factor inhibits apoptosis in epithelial cells." *Neoplasia* 1.6: 508-17.
- Sato, T., Fukazawa, Y., Kojima, H., Enari, M., Iguchi, T, Ohta, Y. (1997) "Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina" *Anat Rec* 248:76-83.
- Shah, B. H., Catt, K. J. (2005) "Roles of LPA3 and COX-2 in implantation" *Trends Endocrinol Metab.* Nov; 16(9):397-9.
- Sharkey, A. M., Smith, S. K. (2003) "The endometrium as a cause of implantation failure" *Best.Pract.Res.Clin.Obstet.Gynaecol.* 17.2: 289-307.
- Sherman, A. I. (1984) "The role of prostaglandins in obstetrics/gynecology" *Spec Top Endocrinol Metab.*; 6:141-61.
- Shooner, C., Caron, P. L., Frechette-Frigon, G., Leblanc, V., Dery, M. C., Asselin, E. (2005) "TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival", *Reprod Biol Endocrinol.* May 31; 3(1):20.
- Simmons, D. L., Botting, R. M., Hla, T. (2004) "Cyclooxygenase Isoenzymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition" *Pharmacological Reviews* 56: 387-437.
- Singh EJ, Baccarini I, Zuspan FP (1975) "Levels of prostaglandins F-2alpha and E-2 in human endometrium during the menstrual cycle" *Am J Obstet Gynecol.* Apr 1; 121(7):1003-6.
- Sugimoto, Y., Yamasaki, A., Segi, E., Tsuboi, K., Aze, Y., Nishimura, T., Oida, H., Yoshida, N., Tanaka, T., Katsuyama, M., Hasumoto, K., Murata, T., Hirata, M., Ushikubi, F., Negishi, M., Ichikawa, A., Narumiya, S. (1997) "Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor" *Science* Aug 1; 277(5326):681-3.

Swinney, D. C., Mak, A. Y., Barnett, J., Ramesha, C. S., (1997) "Differential allosteric regulation of prostaglandin H synthase 1 and 2 by arachidonic acid" *Journal of Biological Chemistry*; 272:12393-12398.

Tachi C, Lindner HR. (1970) "Ultrastructural features of blastocyst attachment and trophoblastic invasion in the rat" *J Reprod Fertil. Feb*; 21(1):37-56.

Tanaka, J., Acosta, T. J., Berisha, B., Tetsuka, M., Matsui, M., Kobayashi, S., Schams, D., Miyamoto, A. (2004) "Relative changes in mRNA expression of angiopoietins and receptors tie in bovine corpus luteum during estrous cycle and prostaglandin F2alpha-induced luteolysis: a possible mechanism for the initiation of luteal regression" *J. Reprod. Dev.* 50:619-626.

Tarachand, U. (1986) "Decidualisation: origin and role of associated cells" *Biology of the Cell*; 57:9-16.

The lancet (1973) "Prostaglandins and the uterus" 829-830.

Tranguch, S., Daikoku, T., Guo, Y., Wang, H., Dey, S.K. (2005) "Molecular complexity in establishing uterine receptivity and implantation" *Cellular and Molecular Life Sciences* 62:1964-1973.

Uotila, P. J., R. U. Erkkola, and P. J. Klemi. (2002) "The expression of cyclooxygenase-1 and -2 in proliferative endometrium and endometrial adenocarcinoma." *Ann. Med.* 34: 428-33.

Vijayakumar, R., Walters, W. A. (1983) "Human luteal tissue prostaglandins, 17 beta-estradiol, and progesterone in relation to the growth and senescence of the corpus luteum" *Fertil Steril. Mar*; 39(3):298-303.

Wang, H., Dey, S. K. (2005) "Lipid signaling in embryo implantation" *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 77.1-4: 84-102.

Welsh, A. O. (1993) "Uterine cell death during implantation and early placentation. " *Microsc Res Tech.* Jun 15; 25(3):223-45.

Welsh, A. O.; Enders, A. C. (1985) "Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degeneration" *Am. J. Anat.* 172:1-29.

Williams, C. S., Mann, M., DuBois, R. N. (1999) "The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development" *Oncogene* 18: 7908-7916.

Universités de Fribourg, Lausanne et Berne, www.embryology.ch/français

Zakar T. and Hertelendry F. (2001) "Regulation of prostaglandin synthesis in the human uterus." *The Journal of Maternal-Fetal Medicine*; 10:223-235.

Wu K.K., Liou J.Y. (2005) "Cellular and molecular biology of prostacyclin synthase." *Biochemical Biophysical Research Communications*, Dec 9; 338 (1) : 45-52.